



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**KONZERVAČNÍ SYSTÉMY PRO PŘÍRODNÍ KOSMETIKU**

PRESERVATIVE SYSTEMS FOR NATURAL COSMETICS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Dana Koblasová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Jana Zemanová, Ph.D.**

**BRNO 2019**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1426/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Dana Koblasová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie  
Vedoucí práce: **Ing. Jana Zemanová, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Konzervační systémy pro přírodní kosmetiku

### Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární rešerši na zadané téma, zejména s důrazem na:
  - problematika trvanlivosti a konzervace kosmetických přípravků
  - přírodní kosmetika a specifika její konzervace
  - přehled nejčastěji používaných systémů, jejich charakterizace, nové trendy
2. V praktické části posuďte antimikrobiální účinky vybraných surovin na některé druhy mikroorganismů.
3. Zjištěná data vyhodnoťte, porovnejte s výstupy literární rešerše a zformulujte závěry práce.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Dana Koblasová  
student(ka)

-----  
Ing. Jana Zemanová, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce je ověření antimikrobiální aktivity přírodně identických konzervantů vůči vybraným mikroorganismům. Teoretická část je zaměřená na rozdělení a popis používaných konzervačních látek přírodních, přírodně identických a syntetických, na bezpečnost syntetických konzervačních látek a na závěr na problematiku kontaminace kosmetických přípravků mikroorganismy. V experimentální části byla ověřena antimikrobiální aktivita 4 přírodně identických konzervantů vůči vybraným mikroorganismům, kterými byly bakterie *Micrococcus luteus*, *Kocuria rosea*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* a kvasinka *Candida vini*.

Testovány byly konzervanty firmy MinaSolve, a to přípravky E-LEEN Green A, který je složen z pentylenglykolu a fenylpropanolu, E-LEEN Green OR, který je směsí citrusových extraktů, kyseliny citronové, askorbové a pentylenglykolu, Green B, složen z kyseliny benzoové, benzoátu sodného a pentylenglykolu a Hexam+, který obsahuje hexamidin diisethionát a pentylenglykol. Antimikrobiální aktivita byla testována jamkovou difuzní metodou.

Nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazoval přípravek Hexam+, nejnižší přípravek E-LEEN Green OR. E-LEEN Green A a Green B nevykazovaly při testované koncentraci 1 % aktivitu vůči žádnému z testovaných mikroorganismů. Z naměřených hodnot inhibičních zón vyplývá, že ze všech mikroorganismů, testovaných v této práci, jsou nejodolnější proti všem přípravkům mikroorganismy *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*, nejméně odolnými jsou *Micrococcus luteus* a *Kocuria rosea*.

## ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis is to evaluate the antimicrobial activity of naturally derived preservatives against selected microorganisms. Theoretical part is focused on description of the most used natural, naturally derived and synthetic preservatives, on the safety of preservatives and finally, the issue of contamination of cosmetic products by microorganisms. In experimental part, antimicrobial activity of 4 naturally derived preservatives was evaluated against selected microorganisms, which were bacteria *Micrococcus luteus*, *Kocuria rosea*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* and one yeast *Candida vini*.

The tested preservatives were from MinaSolve company - E-LEEN Green A, which contains pentylene glycol and phenylpropanol, E-LEEN Green OR, which is composed of citrus extracts, citric acid, ascorbic acid and pentylene glycol, Green B, which contains benzoic acid, sodium benzoate and pentylene glycol and Hexam+, which is a mixture of pentylene glycol and hexamidin diisethionate. Antimicrobial activity was evaluated by agar diffusion method.

The highest antimicrobial activity showed Hexam+, the lowest E-LEEN Green OR. E-LEEN Green A and Green B did not show any antimicrobial activity against any microorganism in the 1% tested concentration. The measured values of the inhibition zones show that the most resistant microorganisms from all the tested in this thesis are *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* and the least resistant are *Micrococcus luteus* and *Kocuria rosea*.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Přírodní konzervanty, kosmetický přípravek, antimikrobiální aktivita, mikroorganismy, kontaminace

## **KEYWORDS**

Natural preservatives, cosmetic product, antimicrobial activity, microorganisms, contamination

KOBLASOVÁ, Dana. *Konzervační systémy pro přírodní kosmetiku*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115665>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ing. Jana Zemanová, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem úplně a správně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studentky

## Obsah

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Kosmetické přípravky.....	8
2.2	Konzervace kosmetiky .....	8
2.3	Syntetické konzervanty.....	9
2.3.1	Aldehydy a látky uvolňující formaldehyd.....	9
2.3.2	Aminy, amidy, pyridiny a benzalkoniové soli .....	11
2.3.3	Alkoholy, fenoly a jejich deriváty .....	12
2.3.4	Ostatní konzervanty.....	12
2.4	Přírodně identické konzervanty .....	13
2.4.1	Organické kyseliny a jejich soli a estery .....	13
2.4.2	Alkoholy a fenoly.....	15
2.5	Přírodní konzervanty .....	15
2.5.1	Esenciální oleje .....	16
2.5.2	Konzervanty Minasolve .....	22
2.5.3	Certifikáty přírodních konzervantů .....	23
2.6	Bezpečnost konzervantů.....	25
2.7	Kontaminace kosmetických přípravků.....	26
2.7.1.	Bakterie .....	27
2.7.2	Plísně a kvasinky .....	29
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
3.1	Seznam použitých chemikálií.....	30
3.2	Seznam použitých pomůcek .....	30
3.3	Použité mikroorganismy.....	30
3.4	Příprava živného bujonu a kultivačního média .....	30
3.5	Příprava testovaných konzervantů.....	31
3.6	Ověření antimikrobiální aktivity .....	32
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	33
5	ZÁVĚR.....	41
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	43
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	51

# 1 ÚVOD

Konzervanty jsou sloučeniny běžně přidávané do kosmetických přípravků, které denně používáme, jejichž hlavním úkolem je inhibovat růst mikroorganismů a prodloužit trvanlivost výrobků. Výrobky bez konzervantů jsou náchylné k mikrobiální kontaminaci a jejich doba použitelnosti je velmi krátká. Bez konzervačních látek se neobejde většina kosmetických přípravků, zejména těch s vyšší aktivitou vody (přibližně 0,6 – 0,9, většina mikroorganismů při  $a_w$  pod 0,6 není schopna růst). Výjimkou mohou být různé oleje nebo přípravky s vyšším obsahem alkoholu apod.

Mikrobiální kontaminace v kosmetice představuje významné riziko pro zdraví spotřebitele, protože kontaminované přípravky mohou vést k podráždění nebo infekci, zejména pokud jsou aplikovány na poškozenou pokožku, oči či jiná citlivá místa [1].

Ke kontaminaci mikroorganismy může dojít například použitými surovinami, zařízením pro výrobu, vodou používanou při výrobě nebo samotným výrobním personálem [2]. Může dojít také k sekundární kontaminaci, tedy kontaminaci spotřebitelem při používání přípravku. Není tedy divu, že mikrobiologická kvalita se stala velmi důležitým aspektem při výrobě kosmetických přípravků.

Konzervanty používané v kosmetice se rozdělují na přírodní, přírodně identické a syntetické. Konzervanty přírodně identického a syntetického původu jsou zatím nepoužívanějšími, v dnešní době se však stále více začínají používat také konzervanty přírodního původu. Nejčastěji používanými konzervanty jsou parabeny (alkylestery kyseliny parahydroxybenzoové), alkoholy jako fenoxylethanol či benzylalkohol, sloučeniny isothiazolinonu nebo donory formaldehydu [3]. Mezi přírodní konzervanty používané v kosmetice se řadí hlavně esenciální oleje, které vykazují antimikrobiální, insekticidní a antioxidační vlastnosti. Sem patří například skořicová silice, hřebíčkový olej, levandulový olej nebo například známý tea tree olej [4].

Cílem této bakalářské práce je zpracování problematiky trvanlivosti a konzervace kosmetických přípravků, přírodní kosmetiky a specifik její konzervace, dále vypracování přehledu nejčastěji používaných systémů a nových trendů a nakonec ověření antimikrobiální aktivity vybraných přírodně identických konzervantů vůči vybraným mikroorganismům, kterými v rámci této bakalářské práce byly čtyři grampozitivní bakterie (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Kocuria rosea* a *Micrococcus luteus*), jedna gramnegativní bakterie (*Serratia marcescens*) a jedna kvasinka (*Candida vini*).

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kosmetické přípravky

„Kosmetickým přípravkem“ se rozumí jakákoli látka nebo směs určená pro styk s vnějšími částmi lidského těla (pokožkou, vlasovým systémem, nehty, rty, vnějšími pohlavními orgány) nebo se zuby a sliznicemi ústní dutiny, výhradně nebo převážně za účelem jejich čištění, parfemace, změny jejich vzhledu, jejich ochrany, jejich udržování v dobrém stavu nebo úpravy tělesných pachů. „Konzervační přísadou“ se rozumí látka, která je výhradně nebo převážně určena k potlačení růstu mikroorganismů v kosmetickém přípravku. Kosmetický přípravek dodávaný na trh musí být bezpečný pro lidské zdraví, je-li používán za obvyklých nebo rozumně předvídatelných podmínek použití [5].

Mezi produkty zahrnuté v této definici patří pleťové, tělové či jiné krémy, parfémy, rtěnky, leštidla na nehty, přípravky na make-up očí a obličej, čistící šampony, výrobky pro trvalé vlny, barvy na vlasy a deodoranty a také jakákoliv látka určená k použití jako složka kosmetického přípravku [6]. Na obalu kosmetického přípravku musí být uvedeny všechny ingredience, a to v pořadí podle klesající koncentrace až k 1 %. Od koncentrace menší než 1 % může být pořadí ingrediencí náhodné. Kosmetické přípravky se z hlediska doby expozice dělí do dvou hlavních skupin, a to na *rinse-off* (přípravky, které se oplachují – doba expozice je přibližně do 20 minut) a *leave-on* (přípravky, které se neoplachují – doba expozice je delší než 20 minut) [5,7].

Kosmetické výrobky jsou také kontrolovány pomocí ISO norem, které určují postup, jakým mají být kosmetické přípravky testovány a také přítomnost kterých mikroorganismů je nutno sledovat. Mezi tyto normy patří například norma ČSN EN ISO 17516 Kosmetika – Mikrobiologie – Mikrobiologické limity [8].

### 2.2 Konzervace kosmetiky

Konzervanty jsou v kosmetických přípravcích přítomny hlavně proto, aby snížily riziko mikrobiální kontaminace výrobku a také k zajištění delší doby trvanlivosti a zajištění zdravotní nezávadnosti po celou dobu používání výrobku spotřebitelem. Příloha V Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích obsahuje seznam konzervačních přísad povolených v kosmetických přípravcích, kterých je 56, podmínky jejich použití a nejvyšší přípustné koncentrace za těchto podmínek [9].

Růst mikroorganismů může vést k rozkladu složek a v důsledku toho ke zhoršení fyzikální a chemické stability výrobku. Obecně, přípravek obsahující vodu, stejně jako další ingredience náchylné k metabolizaci mikroorganismy, vyžaduje odpovídající ochranu [10].

Mikrobiální kontaminace v jakémkoliv kosmetickém výrobku může výrazně ovlivnit jeho kvalitu při výrobě nebo při každodenním používání. I když jsou konzervační látky určeny k zajištění stability výrobku, kosmetika s nadměrným obsahem konzervantů může spotřebiteli



způsobit zdravotní potíže. Mnoho konzervačních látek totiž způsobuje alergické, dráždivé či jiné reakce, pokud jsou aplikovány např. na poškozená místa na kůži [2].

Při výběru konzervační látky do určitého výrobku hraje roli spousta faktorů, nejdůležitějším však je účinnost dané látky proti co nejširšímu spektru mikroorganismů. Látka by dále měla [2]:

- být kompatibilní s ostatními látkami,
- být účinná již při nízkých koncentracích
- zůstat stabilní v širokém rozmezí pH,
- neměla by způsobovat žádné nežádoucí reakce,
- pokud je produkt vícefázový, měla by přetrvávat ve vodné fázi.

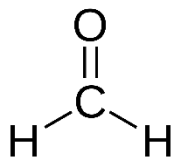
Některé konzervační látky jsou inaktivovány při vyšším pH, takže hodnota pH a také pH optimum dané látky hraje důležitou roli v antimikrobiální aktivitě látky. Najít jeden konzervant, který by splňoval všechny výše uvedené faktory, je téměř nemožné. Musí se brát v potaz také faktory jako je podráždění, rezistence mikroorganismů proti některým látkám, neúčinnost při nízkých koncentracích nebo účinnost pouze proti určitému druhu mikroorganismu. Použití kombinace více látek však řeší tento problém díky synergickému efektu [2].

## 2.3 Syntetické konzervanty

Syntetické konzervanty se vyrábí se různými organickými syntézami. Dělí se do následujících skupin podle prioritní funkční skupiny přítomné v jejich molekule [11]:

- aldehydy a látky uvolňující formaldehyd,
- aminy, amidy, pyridiny a benzalkoniové soli,
- alkoholy, fenoly a jejich deriváty,
- ostatní konzervanty.

### 2.3.1 Aldehydy a látky uvolňující formaldehyd



**Obrázek 1:** Formaldehyd (INCI: Formaldehyde) [12]

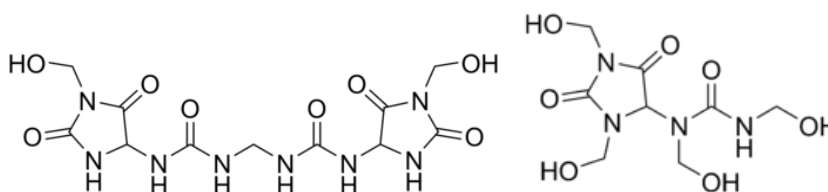
Formaldehyd (**Obrázek 1**) sám o sobě je jako konzervační látka zakázaný v EU i USA. Je to rakovinotvorná látka, způsobuje slzení očí, pocity pálení v očích a krku, nevolnost, dýchací potíže, alergie a při vyšších koncentracích může způsobovat bolesti hlavy či astmatické záchvaty. Studií bylo zjištěno, že přípravek obsahující větší koncentraci než 0,2 % nemůže být považován za bezpečný.

Povoleno je použití látek uvolňujících ve vodných polárních rozpouštědlech formaldehyd, avšak pouze v koncentraci do 0,1 % u přípravků k použití orálně a v koncentraci do 0,2 % v přípravcích k použití na kůži [11].

Sem patří například imidazolidinylurea, diazolidinylurea, hydroxymethylglycinát sodný nebo benzylhemiformal. Například benzylhemiformal v koncentraci 0,15 % uvolňuje formaldehyd v koncentraci 0,044 % a imidazolidinyl urea v koncentraci 0,6 % jej uvolňuje v koncentraci 0,186 %. Patří sem také 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol (bronopol), DMDM hydantoin nebo Quaternium-15 [5,11].

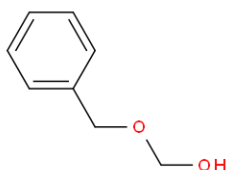
Imidazolidinylurea (**Obrázek 2**) (imidazolidinyl-močovina, IU) se často používá v kombinaci s methyl- či propylparabenem, protože sama není příliš účinná proti plísním a kvasinkám. Její maximální povolená koncentrace je 0,6 %, nejčastěji se používá v koncentraci 0,3 % [5,13].

Diazolidinylurea (**Obrázek 3**) (diazolidinyl-močovina, DU) se stejně jako imidazolidinyl urea používá v kombinaci s parabenem. Sama je účinná zejména proti bakterii rodu *Pseudomonas* a dalším bakteriím a kvasinkám. Její maximální povolená koncentrace je 0,5 %, většinou se používá v koncentracích 0,1-0,3 %. Obě IU i DU jsou dráždivé látky a v několika případech byl zjištěn kontaktní alergický reakce. Otázkou však je, zda se jednalo o alergickou reakci na samotnou močovinu nebo na uvolněný formaldehyd [5,13].



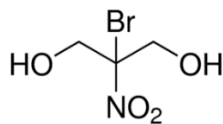
**Obrázek 2 a 3:** Imidazolidinyl močovina (vlevo) a Diazolidinyl močovina (vpravo)  
(INCI: Imidazolidinyl urea, Diazolidinyl urea) [14,15]

Benzylhemiformal (**Obrázek 4**) je povolen pouze v přípravcích, které se oplachují (*rinse-off*) a to v koncentracích do 0,15 %. Kromě kosmetiky se používá také v čisticích prostředcích, v textilním průmyslu či v barvách a lacích [5,13].



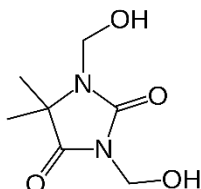
**Obrázek 4:** Benzylhemiformal (INCI: Benzylhemiformal) [16]

Bronopol (**Obrázek 5**), systematickým názvem 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol se používá v koncentracích 0,01-0,10 %. Je aktivní proti plísním, kvasinkám, gram pozitivním i gram negativním bakteriím, zejména proti *Pseudomonas aureginosa*. Používá se též mimo kosmetické přípravky, například v lepidlech, čisticích prostředcích, barvách, lacích či ve farmaceutických produktech [5,13].



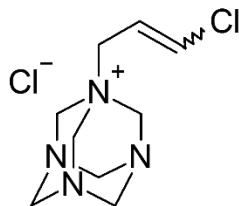
**Obrázek 5:** Bronopol (INCI: Bronopol) [17]

DMDM hydantoin (**Obrázek 6**), systematickým názvem dimethylol-dimethylhydantoin, je aktivní proti plísním, kvasinkám a grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Používá se v koncentracích do 0,6 % a je stabilní při pH 3-9 [5,13].



**Obrázek 6:** Struktura DMDM hydantoinu (INCI: DMDM Hydantoin) [18]

Quaternium-15 (**Obrázek 7**), systematickým názvem hexamethylenetetraamin chloroallyl chlorid, je kvartérní amoniová sůl, která se běžně používá v koncentracích 0,05-0,2 %. Je velmi účinný proti bakteriím, zejména proti rodu *Pseudomonas*, také proti kvasinkám a plísním [5,13].



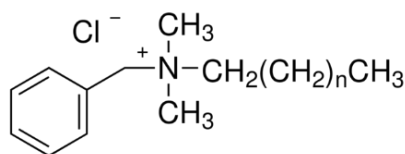
**Obrázek 7:** Quaternium-15 (INCI: Quaternium-15) [19]

### 2.3.2 Aminy, amidy, pyridiny a benzalkoniové soli

Do této skupiny patří například triklokarban, hexamidin, dibromohexamidin, dibromopropamidin, chlorhexidin, benzalkonium chlorid, methenamin, cetylpyridinium chlorid a spousta dalších. Také se do této skupiny mohou řadit některé z látek již zmíněných, jako například Quaternium-15 [11].

Hexamidin, dibromohexamidin a dibromopropamidin se používají v koncentracích do 0,1 %, chlorhexidin je povolen do 0,3 % [5].

Benzalkoniumchlorid (**Obrázek 8**) se vyskytuje především v různých hydratačních krémech a v přípravcích na vlasy. Vyskytuje se též v dezinfekčních prostředcích. Má antiseptické, baktericidní a fungicidní účinky při koncentracích 0,01 - 1,0 %, je účinný zejména proti grampozitivním bakteriím a také proti některým gramnegativním bakteriím. Opakovaná aplikace na kůži může způsobovat kožní záněty [20].

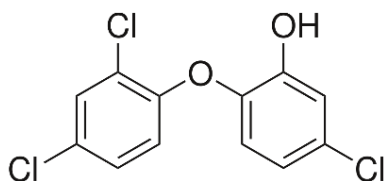


**Obrázek 8:** Benzalkonium chlorid (INCI: Benzalkonium Chloride) [21]

### 2.3.3 Alkoholy, fenoly a jejich deriváty

Mezi alkoholy se řadí fenoxxyethanol, fenoxxyisopropanol, dichlorobenzyl alkohol, benzyl alkohol, nebo již zmiňovaný 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol. Mezi fenoly patří *o*-fenylfenol, *p*-chlor-*m*-kresol nebo například triklosan [11].

Triklosan (**Obrázek 9**), systematickým názvem 5-chloro-2-[2-4-dichloro-phenoxy]-phenol, se přidává například do šamponů, mýdel, krémů, deodorantů, ústních vod či zubních past, avšak jeho použití není tolik časté. Je znám jako endokrinní disruptor (látko, která ovlivňuje syntézu, sekreci, transport, vazbu na receptor, aktivitu receptoru nebo eliminaci hormonu v těle) a může se transformovat na více toxické látky, jako jsou chlorované fenoly nebo mono- a dichlorované aniliny. Z tohoto důvodu je jejich maximální povolená koncentrace 0,3 %. Je účinný proti rodům *Proteus*, *Salmonella* a také proti *Escherichia coli* [22].

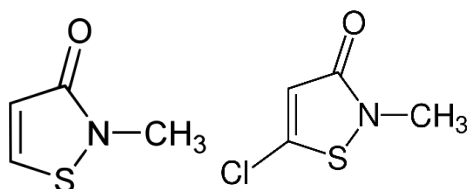


**Obrázek 9:** Triklosan (INCI: Triclosan) [23]

### 2.3.4 Ostatní konzervanty

Do této skupiny se řadí konzervanty, které nespádají ani do jedné z výše zmíněných skupin. Je to například bromo-5-nitro-1,3-dioxan, methylchloroisothiazolinon a methylisothiazolinon [11].

Methylisothiazolinon (**Obrázek 10**) (MI) a methylchloroisothiazolinon (**Obrázek 11**) (MCI) jsou deriváty isothiazolinonu. Používá se buď kombinace obou v poměru 3:1, nebo samotný MI, který však není tak účinný, takže vyžaduje vyšší koncentrace. V porovnání s MCI způsobuje MI jen velmi málo přecitlivělost pokožky, takže je jeho maximální povolená koncentrace vyšší – u MI 0,01 %, u směsi MCI s MI je to 0,0015 % [24].



**Obrázek 10 a 11:** Methylisothiazolinon (vlevo) a Methylchloroisothiazolinon (vpravo)  
(INCI: Methylisothiazolinone, Methylchloroisothiazolinone) [25,26]

## 2.4 Přírodně identické konzervanty

Přírodně identické konzervanty jsou látky, které jsou běžně k nalezení v přírodě (například v rostlinách), ale vyrábí se převážně synteticky z důvodu nižších nákladů a definované čistoty.

### 2.4.1 Organické kyseliny a jejich soli a estery

Mezi tyto látky patří například kyselina dehydrooctová, sorbová, citronová, kyselina propionová a její soli nebo kyselina benzoová a její soli a alkyl estery. Kyselina 4-hydroxybenzoová spolu s jejími alkyl estery je veřejnosti známá pod názvem parabeny. Antimikrobiální aktivita těchto esterů vzrůstá s rostoucím počtem uhlíků v řetězci. Zároveň je však antimikrobiální aktivita jednotlivých esterů selektivní, a tak se využívají především ve směsi, která dokáže zajistit ochranu proti širokému spektru mikroorganismů [11].

#### 2.4.1.1. Kyselina dehydrooctová, sorbová, citronová a propionová

Tyto kyseliny se řadí mezi nejbezpečnější konzervanty a používají se v kosmetice s označením „bio“. Složky bio či přírodní kosmetiky schvalují certifikáty jako jsou ECOCERT nebo NaTrue a používají se také v potravinářství či ve farmacii.

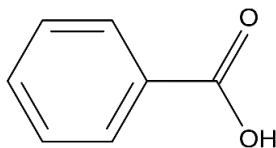
Kyselina dehydrooctová (2H-Pyran-2,4(3H)-dion-3-acetyl-6-methyl) vykazuje antimikrobiální aktivitu v širokém rozmezí pH. Má fungicidní a baktericidní účinek [27].

Kyselina sorbová ((2E,4E)-hexa-2,4-dienová kyselina) zabraňuje růstu kvasinek a plísní. Vyskytuje se především v jeřábu ptačím (*Sorbus aucuparia*), po kterém dostala pojmenování. Lehce maskuje přirozený zápach neparfemovaných složek. Používá se v koncentraci do 0,6 % a je účinná při pH pod 6 [5,28].

Kyselina citronová (2-hydroxy-1,2,3-propantrikarboxylová kyselina) se vyskytuje v ovoci, jako jsou citron, maliny, brusinky či jiné bobulovité ovoce. Používá se v téměř každém kosmetickém přípravku v koncentracích do 4 %, pro přípravky jako jsou krémy, masti a podobné přípravky a až do 10 % pro přípravky, které se oplachují – čistící gely, šampony apod. Může způsobovat zvýšenou citlivost pokožky. Používá se zejména pro úpravu pH, jako chelatační činidlo nebo vonná složka, má však i antibakteriální a antitumorové účinky [29].

Kyselina propionová (kyselina propanová) a její sodné či vápenaté soli mají antibakteriální účinek. V metabolismu se mění na propionyl-koenzym, což je součást běžné metabolické dráhy karboxylových kyselin probíhající v lidském těle. Její maximální povolená koncentrace je do 2 % a inhibuje též růst plísní [5,30].

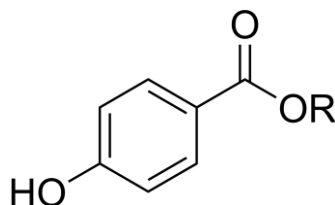
#### 2.4.1.2 Kyselina benzoová



**Obrázek 12:** Kyselina benzoová (INCI: Benzoic acid) [31]

Kyselina benzoová (**Obrázek 12**) je nejjednodušší aromatická karboxylová kyselina. V přírodě se nachází v bobulovitém ovoci, jako jsou například brusinky či borůvky. V játrech je přeměňována na glycin a je vylučována jako kyselina hippurová. Je také meziproduktem metabolismu fenylalaninu v bakteriích. Je účinná proti bakteriím a plísním a hojně se využívá též k ošetření pleti se sklonem k akné. Používá se v koncentracích do 2,5 % pro přípravky, které se oplachují, 1,7 % pro přípravky určené k ústní hygieně a 0,5 % pro přípravky, které se neoplachují. Je účinná pouze při pH pod 4 [5, 32].

#### 2.4.1.3 Parabeny



**Obrázek 13:** Obecný vzorec parabenů ( $R = \text{methyl, ethyl, butyl apod.}$ ) [33]

Parabeny (**Obrázek 13**) jsou alkylestery kyseliny p-hydroxybenzoové a vyrábí se esterifikací s příslušným alkoholem za přítomnosti kyseliny jako katalyzátoru. Jsou bez zápachu, chuti, nezpůsobují žádné zabarvení a jsou prakticky pH neutrální. Využívají se hlavně z důvodu jejich relativně nízké toxicity, širokého spektra antimikrobiální aktivity a nízké ceny. Jsou stabilní v širokém rozmezí pH (4,5 – 7,5) a teplot, při vyšším pH disociují a stávají se neaktivními. Jsou neaktivnější vůči plísním a kvasinkám. Antimikrobiální aktivita u parabenů roste spolu s rostoucím počtem uhlíků v řetězci. Kombinace parabenů má synergický efekt na bakterie, tudíž se ke konzervaci ve většině případů používá kombinace více alkyl esterů [34]. Přirozeně se parabeny vyskytují například v ovoci a zelenině jako jsou jahody, maracuja, borůvky, mrkev, olivy, hrášek či cibule [35].

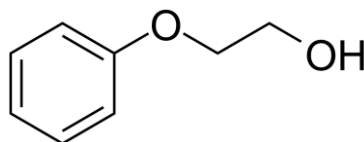
Parabeny snadno pronikají pokožkou, avšak díky kožním enzymům, jako je karboxylesteráza, se rozloží na základní složky a z organismu se vyloučí. Pozornost veřejnosti se parabenům dostalo po publikování britské studie [65], ze které vyplývá, že nemetabolizované parabeny byly nalezeny v nádorech prsu a že vykazují estrogenní aktivitu. Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele (angl. *Scientific Committee on Consumer Safety*, SCCS) však potvrdil, že tato aktivita je tisíc až stotisíckrát nižší, než aktivita přirozeného estrogenu v těle žen, 17 $\beta$ -estradiolu. Přesto však určitou, velmi malou estrogenní aktivitu vykazují, a to zejména s rostoucí délkou řetězce, proto vědecký výbor zakázal v roce 2015 jejich používání (isopropylparaben, isobutylparaben, pentylparaben, benzylparaben a fenylparaben) a omezil používání parabenů se středně dlouhým řetězcem (propyl- a butylparaben) a snížil

také jejich povolené koncentrace na 0,14 % u jednotlivých parabenů a 0,8 % pro jejich směs. Vědecký výbor také potvrdil bezpečnost methyl- a ethylparabenu, pokud jsou použity v koncentracích do 0,4 % pro jednotlivé estery a 0,8 % pro směsi [35].

#### 2.4.2 Alkoholy a fenoly

Mezi alkoholy patřící do skupiny přírodně identických konzervantů se řadí fenoxxyethanol nebo benzylalkohol, které jsou nejpoužívanější. Fenolické sloučeniny jsou též přítomny v přírodě, zejména u rostlin, avšak v této podobě se jako konzervanty využívají málo [11].

Fenoxxyethanol (**Obrázek 14**) se používá v koncentracích do 1,0 %. Je aktivní proti širokému spektru gramnegativních a grampozitivních bakterií, kvasinkám a plísním. Je také používán jako rozpouštědlo a díky tomu se používá ve směsi s jinými konzervanty [5,36]. Benzylalkohol je účinný proti grampozitivním bakteriím a kvasinkám, ale je málo aktivní při pH větším než 7. Optimální pH je 5-6 [37].



**Obrázek 14:** Fenoxxyethanol (INCI: Phenoxxyethanol) [38]

#### 2.5 Přírodní konzervanty

Slovo „přírodní“ se v poslední době stalo velmi vyhledávaným, ať už ve spojení s kosmetikou či jinými produkty, například potravinami. Téměř každý spotřebitel na slovní spojení „přírodní kosmetika“ reaguje a většinou je i ochoten zaplatit vyšší ceny za takové výrobky. Jakákoliv ingredience s dlouhým chemickým názvem vyvolává v lidech pocit, že je nebezpečím pro jeho zdraví a také pro životní prostředí. „Přírodní“ látky se tedy velmi rychle staly něčím, pod čím si lidé představí látky přirozené, dobré a nijak neškodící. Touha spotřebitelů po více přírodních přípravcích přiměla spousty výrobců k tomu, aby své produkty rozšířili o organické a přírodní ingredience [39]. Jelikož přírodní kosmetika a její složení není nijak vymezeno žádnou legislativou, vznikají za účelem jejího ověření různé certifikáty, viz kapitola 2.5.3 Certifikáty přírodních konzervantů.

Důvodem, proč se přírodní konzervanty tolik rozšiřují, je především strach spotřebitelů z konzervantů syntetických, zejména z parabenů. Na trhu se nachází spousta výrobků s označením „bez parabenů“, které ale ovšem neznamená „bez rizika“. Parabeny jsou nejvíce využívané, efektivní a levné kosmetické konzervanty. V roce 2003 a 2004 se o parabenech objevilo několik vědeckých článků [40], zabývajících se jejich potenciální estrogenicitou nebo možným spojením s rakovinou prsu. Tyto účinky však nebyly potvrzeny na 100 %. Přesto však média nutila spotřebitelům tyto informace a začaly se více používat přírodní ingredience [39].

Hlavní nevýhodou přírodních konzervantů je to, že nemají tak široké spektrum účinku jako látky syntetické, jsou málo aktivní při nižších koncentracích, některé mají nepříjemný zápach, zbarvení, některé jsou zase málo kompatibilní s jinými ingrediencemi, mohou způsobovat alergické reakce a iritaci kůže a jejich použití je v porovnání se syntetickými konzervanty pro

výrobce mnohem dražší [41]. Většina z nich není aktivní proti *Pseudomonas spp.* a jiným gramnegativním bakteriím, které jsou hlavními mikrobiálními kontaminanty v kosmetice (viz kapitola 2.7 Kontaminace kosmetických přípravků) [39]. Výjimkou mohou být esenciální oleje.

Při zavádění přírodních látek jako konzervantů do kosmetických výrobků se tedy posuzuje, zda působí proti širokému spektru mikroorganismů, při jaké koncentraci jsou aktivní, zda-li mají zápach či zbarvení, které by ovlivnilo vzhled a vůni výsledného produktu, zda se dají lehce kombinovat s ostatními ingrediencemi a zda-li nezpůsobují podráždění či alergické reakce. V neposlední řadě také výrobci vybírají suroviny podle ceny [39].

### 2.5.1 Esenciální oleje

Esenciální oleje mají široké spektrum různých účinků, mezi které se řadí například spasmolytický, antinociceptivní (působící proti vedení bolestivých podnětů), antioxidační, imunomodulační (zvyšující obranyschopnost organismu) či psychotropní. Díky tomuto se hojně využívají v medicíně a aromaterapii. Mají též antivirové a vynikající antimikrobiální účinky proti širokému spektru grampozitivních i gramnegativních bakterií a také působí proti některým plísním a kvasinkám. Extrakty z rostlin se využívaly pro léčení infekčních onemocnění už od dávných dob i přesto, že neexistovala téměř žádná znalost mikroorganismů [39].

Esenciální oleje jsou jemné, aromatické a těkavé oleje extrahované z různých částí rostlin, jako jsou například květy, semena, listy, stonky či kořeny nejrůznějších bylin a stromů destilací. Použití esenciálních olejů může mít hned několik výhod, a to příjemné aroma, antimikrobiální účinek a v některých případech také zlepšení dermato-kosmetických vlastností [42].

Bylo zjištěno, že inhibiční účinky esenciálních olejů lze zvýšit například kombinací s jinými sloučeninami nebo faktory jako jsou nízké pH, nízká teplota anebo použití chelatačních činidel, jako je například ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA). Chelatační činidla zvyšují propustnost buněčných membrán a činí je tak citlivější k antimikrobiálním činidlům. Předpokládá se, že buněčná stěna z lipopolysacharidů gramnegativních bakterií brání přístupu složkám esenciálních olejů k cytoplasmatické membráně, tudíž chelatační činidla mohou být opravdu významnou ingrediencí zvyšující antimikrobiální aktivitu esenciálních olejů, zvláště pro kontrolu gramnegativních bakterií, které mají zvýšenou rezistenci vůči antimikrobiálním činidlům [43].

Esenciální oleje však také musí být používány s opatrností, protože mohou způsobovat alergické reakce spojené s aplikací na kůži, protože obsahují velké spektrum různých látek. Kvůli jejich vysoké těkavosti mají zvýšený nárok na skladování, musí například být uzavřeny ve vzduchotěsných nádobách a neměly by se vystavovat světlu. Tyto podmínky komplikují jejich použití ve výrobcích každodenní potřeby [42].

Složení esenciálních olejů je velmi široké. Mohou obsahovat 20 až 60 různých bioaktivních složek, přičemž můžeme nalézt 2 – 3 složky přítomné ve vysokých koncentracích (20-70 %) v porovnání s ostatními složkami, které jsou přítomné ve stopovém množství. Většina esenciálních olejů je složena z terpenů, terpenoidů a ostatních aromatických



a alifatických složek s nízkou molární hmotností, přičemž nejzastoupenější složkou (až 90 %) jsou monoterpeny. Složení esenciálních olejů však závisí na klimatických podmínkách, ve kterých rostliny rostou, na tom, ze které části rostliny je získán extrakt, a také na době sklizně [43].

Studie také ukazují, že esenciální oleje jsou schopny inhibovat růst bakterií, které jsou spojeny s různými infekcemi kůže, například *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum* nebo *Staphylococcus epidermidis*. Bylo zjištěno, že oleje s obsahem linaloolu a  $\alpha$ -terpineolu jsou aktivní proti *Propionibacterium acnes* a *Staphylococcus epidermidis*. Nejlepších výsledků však dosahují oleje s obsahem limonenu, proto se tyto oleje používají v kosmetických přípravcích za účelem prevence infekcí. Patří sem různé oleje citrusů, olej z tymiánu či hřebíčku [43].

V následující tabulce (**Tabulka č.1**) jsou uvedeny některé rostliny, jejichž oleje mají antimikrobiální vlastnosti a jejich složení.

**Tabulka č. 1:** Některé esenciální oleje a jejich antimikrobiální vlastnosti [43].

Název rostliny	Hlavní chemické sloučeniny	Inhibované mikroorganismy	Zdroj
Skořicovník ( <i>Cinnamomum zeylancium</i> )	Cinnamaldehyd	Enterobacteriaceae, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i>	[44]
Světlík lékařský ( <i>Euphrasia rostkoviana</i> )	n-hexadekanová kyselina, thymol, myristová kyselina, linalool	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i>	[45]
Polej obecná (máta polej) ( <i>Mentha pulegium</i> )	Piperiton, piperitenon, $\alpha$ -terpineol, pulegon	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i>	[46,47]

**Tabulka č. 1 – pokračování: Některé esenciální oleje a jejich antimikrobiální vlastnosti [43].**

<b>Název rostliny</b>	<b>Hlavní chemické sloučeniny</b>	<b>Inhibované mikroorganismy</b>	<b>Zdroj</b>
Kajeput střídavolistý (čajovníkový strom) ( <i>Melaleuca alternifolia</i> )	Terpinen-4-ol, 1,8-cineol, $\gamma$ -terpinen, $\alpha$ -terpinen, terpinolen	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Alternaria spp.</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i>	[48, 49]
Myrta obecná ( <i>Myrtus communis</i> )	Eugenol, $\alpha$ -terpineol, $\gamma$ -terpinen	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	[50]
Bazalka ( <i>Ocimum</i> )	Eugenol, methyl eugenol, cis-ocimen, trans-ocimen, $\alpha$ -pinen, kamfor	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas mirabilis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Mucor mucedo</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus versicolor</i>	[51, 52]
Dobromysl obecná (oregano) ( <i>Origanum vulgare</i> )	Karvakrol, thymol, $\gamma$ -terpinen, cis-piperitol, borneol, terpinen-4-ol, linalool	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Candida albicans</i>	[53]

**Tabulka č. 1 – pokračování: Některé esenciální oleje a jejich antimikrobiální vlastnosti [43].**

Název rostliny	Hlavní chemické sloučeniny	Inhibované mikroorganismy	Zdroj
Tymián ( <i>Thymus kotschyanus</i> a <i>Thymus quinquecostatus</i> )	karvakrol, 1,8-cineol, thymol, borneol, E-karyofylen	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i>	[55]
Rozmarýn lékařský ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	kamfor, kamfen, limonene, geraniol, myrcen, linalool benzoylacetát, linalool, $\alpha$ -pinen, $\alpha$ -terpinolen, bornylacetát, borneol	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Candida albicans</i>	[56, 57]
Hřebíček ( <i>Eugenia caryophyllata</i> )	Fenylpropanoidy (karvakrol, thymol, eugenol, cinnamaldehyd)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i>	[58]

- Skořicovník**

Skořicovník je tropický stálezelený strom rostoucí na Srí Lance, Madagaskaru v Indii a Indočíně. Pro extrakci oleje ze skořicovníku se používá jeho kůra. Používá se také jako ochucovadlo a vonná složka. Hlavními složkami oleje jsou E-cinnamaldehyd, benzaldehyd, E-cinnamyl acetát a limonen. Olej ze skořicovníku má antibakteriální vlastnosti. Je aktivní proti grampozitivním bakteriím rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* a také proti gramnegativním bakteriím, zahrnujícím *Pseudomonas aeruginosa*. Kromě antimikrobiálních vlastností má také insekticidní, antityrosinázovou, antioxidační a antimutagenní aktivitu [44].

- Světlík lékařský**

Světlík lékařský roste téměř v celé Evropě a využití mají zejména květy této rostliny. Používá se proti suchému kašli, pro léčbu nachlazení, bolesti uší a hlavy, purulentní kožní lézi a zejména jako oční kapky k léčbě a prevenci různých očních poruch. Má antioxidační, protizánětlivé a antimikrobiální vlastnosti. Je aktivní zejména proti grampozitivním bakteriím, jako *Staphylococcus epidermidis* nebo *Staphylococcus aureus* [45].

- **Polej obecná (máta polej)**

Hlavní složkou oleje z máty polej je piperiton, piperitenon,  $\alpha$ -terpineol a pulegon. Používá se nejčastěji jako ochucující či vonná složka. Pomáhá s nadýmáním, křečemi či bolestí hlavy, používá se při léčbě mírnějších infekcí dýchacích cest a také stimuluje svaly dělohy. Léčivé vlastnosti máty jsou spojeny s přítomností monoterpenů a také derivátů polyfenolů, které jsou známé pro své antioxidační účinky. Má antioxidační a antimikrobiální vlastnosti, baktericidní a bakteriostatický účinek. Je aktivní proti *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* či *Pseudomonas aeruginosa* [46, 47].

- **Čajovníkový strom**

Olej z čajovníku obsahuje hlavně monoterpeny a alkoholy, hlavní složkou je terpinen-4-ol, díky kterému má tea tree olej své antimikrobiální vlastnosti. Narušuje strukturu buněčné membrány MO a blokuje jejich dýchací řetězec. 1,8-cineol, který je také jednou z hlavních komponent, zvyšuje propustnost membrány, což usnadňuje prostup dalších antimikrobiálních látek. Má také protizánětlivé a také baktericidní účinky. Klinické studie prokazují, že čajovníkový olej má pozitivní efekt na různé infekce, jako například akné či ústní kandidózu. Používá se do produktů pro intimní hygienu, protože působí proti kvasinkám a plísním. Z bakterií je aktivní proti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* nebo *Pseudomonas aeruginosa* [48, 49].

- **Myrta obecná**

Hlavními složkami myrty jsou eugenol,  $\alpha$ -terpineol a  $\gamma$ -terpinen. Květy, listy a plody myrty se používají pro vnější aplikace na hojení ran, pro různé onemocnění kůže, jako například psoriáza či opary nebo také pro léčbu zánětů močových cest. Největší využití však má v léčbě respiračních onemocnění. Olej z této rostliny má hypoglykemické, antimikrobiální, analgetické a antioxidační vlastnosti. Je aktivní proti grampozitivním bakteriím, jako jsou *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Bacillus subtilis* a také proti kvasinkám rodu *Candida* [50].

- **Bazalka**

Rod *Ocimum*, do kterého bazalka patří, má asi 50-150 různých druhů, které se liší složením a tudíž i vlastnostmi jejich esenciálních olejů. Hlavní složkou však ve většině případů je  $\alpha$ -pinen a eugenol. Používá se zejména jako koření, ale má také antimikrobiální, antioxidační, antipyretické a insekticidní účinky. Předpokládá se, že za antimikrobiální vlastnosti je odpovědná složka methyl-eugenol. Druhy bazalky, které obsahují větší množství eugenolu se dají považovat za antikoagulacia, jelikož eugenol má schopnost inhibovat srážení krevních buněk. Je aktivní proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím, jako jsou *Staphylococcus aureus*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* nebo *Pseudomonas aeruginosa*, a také proti některým kvasinkám a plísním [51, 52].

- **Dobromysl obecná**

Dobromysl obecná je veřejnosti známá jako oregano. Hlavními složkami oleje z oregana jsou karvakrol a thymol. Největší antimikrobiální aktivitu mají druhy obsahující vysoké procento fenolických látek, jako jsou právě karvakrol a thymol. Další vysoce zastoupenou složkou je p-kumen, který sám o sobě příliš antimikrobiálně nepůsobí, avšak v kombinaci s karvakrolem byl zjištěn synergický efekt proti *Bacillus cereus*. Je aktivní proti bakteriím, jako například *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* či *Escherichia coli*, proti kvasinkám a také plísním, jako *Aspergillus niger* nebo *Penicillium chrysogenum* [53]. Ve studii z roku 2018 [54] bylo zjištěno, že olej z oregana pozitivně působí akné. Dvě skupiny myši byly infikovány bakterií *P. acnes*, první skupině se poté na kůži aplikoval erythromycin, standardní antibiotikum k léčbě akné a druhé skupině olej z oregana. Po dvou dnech klesl počet bakterií u první skupiny z  $1 \cdot 10^8$  KTJ·ml<sup>-1</sup> na  $3,5 \cdot 10^3$  KTJ·ml<sup>-1</sup> a u druhé skupiny klesl na  $4,3 \cdot 10^1$  KTJ·ml<sup>-1</sup>, z čehož lze usoudit, že by olej z oregana mohl částečně nahradit některá antibiotika užívaná k léčbě akné.

- **Tymián**

Tymiánové oleje jsou dobře známé jako rostliny používané v medicíně kvůli jejich biologickým a farmakologickým vlastnostem. Pro extrakci se používají květy a listy. Složení olejů z rostlin tymiánu se velmi liší podle toho, v jakém stádiu růstu rostlina právě je. Hlavní složkou těchto olejů je karvakrol, thymol,  $\gamma$ -terpinen, p-kumen a borneol. Esenciální oleje s obsahem karvakrolu nebo thymolu mají vysokou antimikrobiální aktivitu. *Thymus kotschyanus* má antibakteriální účinek nejvíce proti *Candida albicans* a *Bacillus cereus*. Gramnegativní bakterie jsou vůči tomuto oleji odolnější než grampozitivní. Je aktivní také proti *Staphylococcus epidermidis*, což je oportunní patogen v souvislosti s cizím tělesem, což může být například štetec na make-up, sprchová houba apod [55]

- **Rozmarýn lékařský**

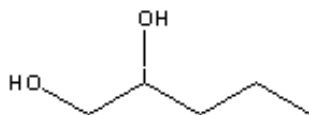
Hlavní složkou rozmarýnového oleje je 1,8-cineol,  $\alpha$ -pinen, kamfor, borneol, limonen a  $\beta$ -karyofylen. V kosmetice je nejvyužívanější extrakt z listů nebo olej z listů. Produkty obsahující extrakty z rozmarýnu mohou být aplikovány na dětskou pokožku (například 0,012% extrakt z listů se používá v některých dětských olejích či krémech), mohou se používat do produktů, které mohou být náhodně požitý (např. rtěnka) a také v produktech aplikovaných kolem očí. Používá se jako koření, má antibakteriální účinky a také je aktivní proti houbám. Je aktivní proti *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a *Proteus vulgaris*. Ze studie publikované v roce 2018 vyplývá, že  $\alpha$ -pinen je aktivní proti *Escherichia coli* a *Candida albicans*, kdežto limonen je aktivní proti *Staphylococcus aureus* [56, 57].

- **Hřebíček**

Hřebíčkový olej nachází uplatnění v dentální péči jako antiseptikum a analgetikum, je totiž aktivní proti mikroorganismům způsobujícím různé dentální problémy. Je aktivní také proti mnoha dalším organismům, jako například *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes* nebo *Staphylococcus epidermidis*. Působí také proti houbám a plísním a má antimutagenní a antialergenní účinky. Vyvolává apoptózu lidských rakovinných buněk a je považován za efektivní ochranu proti virovým infekcím. Eugenol, hlavní složka hřebíčkového oleje, vykazuje antioxidační a insekticidní účinek [58].

### 2.5.2 Konzervanty Minasolve

Minasolve je francouzská společnost vyrábějící víceúčelové látky pro kosmetické aplikace založené na ekologických a udržitelných výrobních procesech. Její sesterská společnost Pennakem vyvinula vlastní ekologický výrobní proces pro výrobu 1,2-pentandiolu, konzervantu účinného proti širokému spektru mikroorganismů, a to využitím odpadních surovin ze zpracování cukrové třtiny a kukuřičných klasů. Společnost Minasolve se nyní snaží vyvinout další konzervační systémy, které by odpovídaly požadavkům spotřebitele [59].



**Obrázek 15:** vzorec 1,2-pentandiolu (INCI: Pentylene glycol) [15]

- **E-LEEN Green A**

E-LEEN Green A je kombinace pentylenglykolu a fenylpropanolu se synergickým efektem. Obě tyto látky jsou vyráběny ekologickými postupy (postupy, které minimalizují použití a vznik nebezpečných látek) a splňují požadavky přírodních kosmetických certifikátů COSMOS a NaTrue. Má zvlhčující účinky a je lehce parfemovaný. Je rozpustný ve vodě do koncentrace až 3% a je vhodný pro čiré výrobky na bázi vody. Je aktivní proti bakteriím, plísním i houbám v rozmezí pH 3 – 10 [59].

- **E-LEEN Green OR**

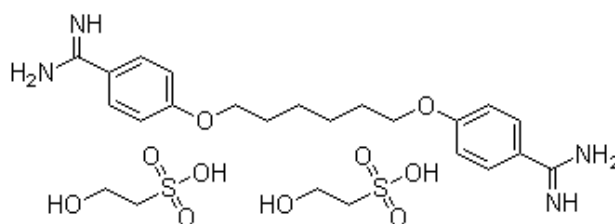
E-LEEN Green OR je multifunkční ingredience, která se používá nejčastěji jako antioxidant, vykazuje ale i antimikrobiální aktivitu a tak může sloužit jako konzervant. Je kombinací citrusových extraktů (pomerančovník hořký, mandarinka a extrakt z kůry pomeranče), kyseliny askorbové a citronové a již zmíněného pentylenglykolu. Extrakt z pomerančovníku hořkého obsahuje jako hlavní složky linalool,  $\alpha$ -terpineol, limonen a linalyl acetát, které mají protizánětlivé účinky. Je bez zápachu a bez zabarvení a splňuje požadavky kosmetického certifikátu COSMOS. Je vhodný pro kosmetické přípravky, které se neoplachují (krémy, mastičky apod.). Je aktivní proti bakteriím, kvasinkám a plísním v rozmezí pH 3 – 6,5. Používá se v koncentracích 1 – 3 %, maximální povolená koncentrace je 5,5 % [59, 60].

- **MinaSolve Green B**

MinaSolve Green B je směsí pentylenglykolu, vody, kyseliny benzoové a její sodné soli, benzoátu sodného. Kyselina benzoová je účinná proti bakteriím a plísním a hojně se využívá k ošetření pleti se sklonem k akné. Směs je ve vodě rozpustná a je kompatibilní se všemi přípravky na bázi vody. Vykazuje široké spektrum antimikrobiální aktivity, má hydratační účinky pro pokožku a je schválen společností COSMOS. Je aktivní proti bakteriím, kvasinkám a plísním v rozmezí pH 4 – 6 a jeho aktivita roste se snižujícím se pH. Používá se v koncentracích 1 – 3 %, maximální povolená koncentrace je 5 % [32, 59].

- **MinaSolve Hexam+**

MinaSolve Hexam+ je směsí pentylenglykolu, vody a hexamidinu diisethionátu. Hexamidin diisethionát se používá v některých kosmetických přípravcích v koncentracích od 0,03 do 1 %. Používá se také jako změkčovaadlo a činidlo proti pění. Byl dermatologicky testován jako 2% vodný roztok, nedráždí kůži a sliznice a je tak vhodný pro produkty, které se neoplachují a aplikují se na citlivé oblasti pokožky, jako například kolem očí, nebo pro produkty určené na citlivou pokožku. Synergický efekt pentylenglykolu s hexamidinem zajišťuje širokou antimikrobiální aktivitu v rozmezí pH 3 – 6,5 a kompletní ochranu kosmetických výrobků. Je vhodný pro vodné roztoky, emulze a systémy na bázi povrchově aktivních látek. Používá se v koncentracích 0,2 – 2 %, pro přípravky určené k ústní hygieně či na oči (zubní pasty, makeup apod.) v koncentraci maximálně 1 % [59, 61].



**Obrázek 16:** Vzorec hexamidinu diisethionátu (INCI: Hexamidine diisethionate) [62]

### 2.5.3 Certifikáty přírodních konzervantů

Jelikož v legislativě nejsou přírodní konzervanty, na rozdíl od těch syntetických, nijak specifikovány, vznikají různé certifikáty, podle kterých je kontrolováno, jaké ingredience přípravek obsahuje, a je to jediné potvrzení pro spotřebitele, že přípravek neobsahuje téměř žádné syntetické konzervanty. Dále jsou uvedeny některé z těchto certifikátů.

### 2.5.3.1 Certifikát ECOCERT



**Obrázek 17:** Logo společnosti ECOCERT [63]

Společnost ECOCERT se zabývá kontrolou a certifikací výrobků, které obsahují suroviny z ekologického zemědělství a patří mezi největší společnosti zabývající se touto problematikou. Podle tohoto certifikátu musí produkt obsahovat minimálně 95 % přírodně se vyskytujících ingrediencí. Tento certifikát schvaluje všechny přírodně identické konzervanty, tedy kyselinu sorbovou, benzoovou, salicylovou, dehydrooctovou a jejich soli a také benzylalkohol. Schvaluje však také použití fenoxylethanolu a parabenů pro konzervaci ingrediencí. Tyto látky tedy musí být uvedeny na obalu kosmetického výrobku [39].

### 2.5.3.2 Certifikát NaTrue



**Obrázek 18:** Logo společnosti NaTrue [64]

Certifikát NaTrue zaručuje, že výrobky jsou nejméně ze 75 % přírodní, přičemž všechny složky musí být přírodního původu nebo v bio kvalitě. Zajišťuje také, že během výroby byly použity postupy, které jsou šetrné k životnímu prostředí. Schvaluje použití kyseliny benzoové, propionové, salicylové a sorbové a jejich soli a také benzylalkohol, tedy látky přírodně identické [39].

### 2.5.3.3. Certifikát USDA



**Obrázek 19:** Logo společnosti USDA [65]

Pokud spotřebitel hledá opravdu přírodní produkt, měl by hledat právě tento certifikát. Podle něho mají být produkty tvořeny z 95% látkami přírodními, bez jakýchkoliv povolených syntetických konzervantů [39]. Tento certifikát se však vyskytuje pouze u méně známých značek kosmetiky, které nejsou k dostání v běžných obchodech, protože použití 100% přírodních surovin je pro výrobce značek, které denně vyrábí a prodávají miliony produktů po světě, drahé.



## 2.6 Bezpečnost konzervantů

Pro konzervační látky používané v kosmetických výrobcích existuje podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 seznam povolených látek. Tyto látky mají různé mechanismy antimikrobiálního účinku, v závislosti na jejich struktuře a funkční skupině. Konzervační látky působí na několika místech v buňce, jejich použití ve vyšších koncentracích může být více efektivní z hlediska ochrany před mikroorganismy, ale zároveň může být toxické pro spotřebitele. Při použití nízkých koncentrací si zase mohou mikroorganismy vyvinout rezistenci proti těmto látkám [66].

Jak už bylo zmíněno (viz kapitola 2.2 Konzervace kosmetiky), konzervant je látka přírodního či syntetického původu používaná k inhibici růstu mikroorganismů. Měla by být efektivní proti širokému spektru mikroorganismů a měla by působit déle než je doba spotřeby samotného produktu. Látka by také neměla pouze inhibovat růst, ale také zabránit mikroorganismům, aby se na ni adaptovaly a vytvořily si zmíněnou rezistenci.

Při vývoji nového konzervačního systému nebo při výběru stávajícího by měly být brány v potaz čtyři hlavní oblasti týkající se posouzení bezpečnosti a rizika spotřebitelů [66]:

- identifikace nebezpečnosti, zahrnující potenciální toxické účinky spojené s danou látkou
- hodnocení odezvy na dávku, neboli jaká koncentrace už vyvolává nežádoucí účinek
- expozice (skutečné použití výrobku spotřebitelem), vliv na toxicitu může mít způsob expozice, její trvání, rozsah a frekvence
- charakterizace rizika, neboli uvedení známých rizik při rozumném a rozumně předvídatelném použití.

Nežádoucí účinky se mohou objevit buď hned po prvním použití, nebo až po dlouhé době používání. Tyto účinky se mohou pohybovat v rozmezí od mírného podráždění po estrogenní aktivitu. Hned po parfemujících složkách jsou konzervanty druhou největší skupinou alergenů v kosmetice. Existuje přímé spojení mezi antimikrobiálním účinkem a schopností vyvolat toxicitu. To vysvětluje, proč nejvíce efektivní konzervanty jsou zároveň těmi s největším toxickým potenciálem [66].

Methylisothiazolinon a methylchloroisothiazolinon způsobují alergické reakce a v některých případech kontaktní dermatitidu. Formaldehyd způsobuje silné podráždění pokožky, a proto se jako konzervant sám o sobě nepoužívá. Používají se látky uvolňující formaldehyd, které postupně uvolňují formaldehyd ve velmi nízkých koncentracích podle potřeby. Takto zůstane koncentrace volného formaldehydu v produktu nízká, ale dostatečná pro eliminaci růstu bakterií. U některých lidí tyto látky mohou vyvolat alergickou reakci nebo kontaktní dermatitidu. Triklosan reaguje s chlorem za vzniku chloroformu a 2-(2,4-dichlorofenoxy)fenolu, které jsou považovány za možné lidské karcinogeny. Reagovat může například s chlorem z pitné vody či s chlorem z bazénové vody apod. Chlorhexidin se používá v nízkých koncentracích jako antiseptikum. Přípravky, které obsahují chlorhexidin ve vyšších koncentracích nesmí přijít do kontaktu s očima (mohou způsobit úplné oslepnutí nebo rohovkový vřed) nebo s vnitřním uchem (hrozí ztráta sluchu) [11].

Na téma bezpečnosti parabenů vzniklo mnoho studií [67, 68, 69], z nichž některé tvrdí, že může existovat spojitost mezi aplikací deodorantů a antiperspirantů s obsahem parabenů a vznikem nádoru prsu. Ze žádné ze studií však nelze jednoznačně vyvodit, že tomu tak opravdu je. Použití parabenů je při rozumném a rozumně předvídatelném použití bezpečné a nevyvolává podráždění kůže. Výjimkou mohou být jedinci s velmi citlivou pokožkou nebo aplikace přípravků s parabenem na poškozenou pokožku.

## 2.7 Kontaminace kosmetických přípravků

Kontaminace kosmetického přípravku může začít již v samotném výrobním prostoru. Navzdory všem ochranným prostředkům, jako jsou rukavice, pláště a pokrývky hlavy z pracovníků opadávají odumřelé kožní buňky. Pracovníci také do výrobních prostor nosí prach z venkovního prostředí. Dále se ve vzduchu mohou vyskytovat gramnegativní bakterie přítomné ve vodě, například z umyvadel, odtoku či přítoku vody nebo z různých parních přístrojů. Může dojít také ke kontaminaci prostřednictvím použitých surovin, je proto důležité kontrolovat mikrobiální kontaminaci již od začátku výroby [3].

Nejčastěji představují riziko mikroorganismy jako jsou *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* a *Enterobacter gergoviae*. Mezi dalšími se potom vyskytují mezofilní aerobní mikroorganismy *Enterobacter cloacae*, *Achromabacter xylosoxidans*, *Rhizobium radiobacter*, *Pantoea agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas putida*, *Enterococcus faecium* a *Klebsiella pneumoniae*. Tyto mikroorganismy mohou poškodit zdraví spotřebitele. Na základě zamýšleného použití obsahují kosmetické přípravky látky, jako jsou alkoholy, vosky, lipidy, polysacharidy, vitamíny a proteiny, které jsou živinami pro mikrobiální růst [3].

Z hlediska posouzení bezpečnosti existují dvě hlavní kategorie kosmetických přípravků:

- produkty pro děti do 3 let nebo produkty, které mají být aplikovány v okolí očí nebo sliznic
- ostatní kosmetické produkty.

Produkty v první kategorii by neměly obsahovat více než  $102 \text{ KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$  nebo  $\text{ml}^{-1}$  aerobních mezofilních mikroorganismů. Ve druhé skupině nesmí být detekovány *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, a *Candida albicans* [3].

Mikrobiální kontaminace může způsobit různé změny z hlediska kvality výrobků. Mohou to být změny fyzikální, chemické, fyzikálně-chemické a senzorické, což je může činit nevhodnými pro použití. Může například způsobit změnu vzhledu výrobku či změnu konzistence, může způsobit také viditelný růst, například čisté roztoky jsou po kontaminaci zakalené. Může dojít též k separaci fází. Krémy a gely jsou často dvoufázové polotuhé přípravky složené z olejové a vodné fáze v určitém poměru. Pseudomonády jsou známy nejen rozdělením fází, ale také vznikem zápachu – jsou totiž schopny rozkládat uhlovodíky a tuky a také ztekucovat želatinu [3].

### 2.7.1. Bakterie

Bakterie patří mezi prokaryotické organismy. Mívají nejčastěji kokovitý nebo tyčinkovitý tvar a jejich velikost je v řádech mikrometrů. Buněčná stěna bakterií se skládá z peptidoglykanu mureinu, díky kterému je buněčná stěna pevná. Uvnitř buňky na rozdíl od eukaryotických organismů není jádro ale pouze nukleoid, což je kruhová molekula DNA. Dále jsou v buňce přítomny plazmidy a ribozomy. Jsou největší skupinou organismů na světě. Na základě Gramova barvení se dělí na grampozitivní a gramnegativní [70].

Mezi nejčastěji se vyskytující bakterie v kosmetických přípravcích se řadí *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* a *Enterobacter gergoviae*.

- ***Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* je pohyblivá gramnegativní bakterie. Vyskytuje se nejvíce v odpadních vodách, na rostlinách a v půdě. Je nenáročná, roste na základních půdách při 30-37 °C, ale dokáže růst i při pokojové teplotě. Může způsobit infekci kteréhokoliv orgánu, mezi nejčastější patří infekce oka či porušených míst na kůži. V nemocničním prostředí kontaminuje katétry, dýchací přístroje apod. a způsobuje tak záněty močového ústrojí či sliznice dýchacích cest. Způsobuje je především u osob s porušenou imunitou, s poraněnou pokožkou nebo s dlouhodobě zavedenými cévkami apod [71].

- ***Serratia marcescens***

*Serratia marcescens* je gramnegativní bakterie, která je zdrojem nosokomiální infekce (infekce získaná v nemocnici). Největší riziko infekce touto bakterií se vyskytuje u dětí. Bylo dokonce hlášeno úmrtí dítěte po použití dětského šamponu kontaminovaného *S. marcescens*. Vyskytuje se v půdě, ve vodě nebo na rostlinách. Dobře se jí daří ve vlhkém prostředí, a tak se často nachází v koupelnách, zejména ve spojích kachlíček nebo například v rozích van nebo sprchových koutů, kde se projevuje tvorbou růžového až oranžového zbarvení a slizkým filmem, přičemž jako zdroj pro růst využívá fosfor nebo tuky obsažené ve zbytcích mýdla, šamponu a podobně [72].

- ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* je nejprozkoumanější bakterií vůbec. Je to gramnegativní bakterie a má široké rozmezí teplot, při kterých roste (8 – 48 °C), optimální je však teplota 37 °C. Je přirozenou součástí lidské střevní mikroflory. Způsobuje například záněty močových cest nebo různé infekce provázené průjmy. Má různé enteropatogenní kmeny. Do kosmetických produktů se může dostat při výrobě, pokud byla použita voda kontaminovaná *Escherichia coli* [73].

- ***Burkholderia cepacia***

*Burkholderia cepacia* vykazuje podobné vlastnosti jako rod *Pseudomonas*. V medicínském významu jsou důležité z hlediska nosokomiálních nákaz. Je to oportunní patogen a patří k jedné z nejčastěji izolovaných bakterií z kosmetických produktů. Stále více je rezistentní proti

používaným konzervačním systémům, zejména proti parabenům. Je také odolná vůči dezinfekčním prostředkům jako je chlorhexidin. Může také způsobit infekce urogenitálního traktu žen prostřednictvím gelu, který se používá ke gynekologickému vyšetření [74].

- ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* patří mezi nejčastější mikrobiální kontaminanty v kosmetice a způsobuje různé kožní infekce. Může například kolonizovat nebo infikovat ekzémy rukou a tím prodloužit hojení kůže [75]. Je to grampozitivní bakterie a kvůli žluté barvě kolonií se jí také říká zlatý stafylokok. Asi 1/3 populace má tuto bakterii přirozeně na kůži, takže do kosmetických produktů se může dostat při výrobě z rukou pracovníků nebo při používání z rukou spotřebitele.

- ***Propionibacterium acnes***

*Propionibacterium acnes* je grampozitivní bakterie související s výskytem akné. Je součástí běžné mikroflory kůže a živí se mastnými kyselinami obsaženými v kožním mazu. Nejnovější poznatky říkají, že důležitou roli při vzniku akné hraje rovnováha fylogrup této bakterie s ostatními mikroorganismy přítomnými na kůži člověka. *P. acnes* není přímo spouštěčem akné, jelikož bylo zjištěno, že u pacientů s akné se tento mikroorganismus nevyskytuje ve větší míře než u jedinců bez akné. K tomuto chronickému zánětlivému stavu může dojít při ztrátě kožní mikrobiální diverzity spolu s vrozenou zhoršenou imunitou. Běžně se na kůži vyskytují bakterie rodu *Corynebacteria*, *Propionibacteria* a *Staphylococcus*. Rovnováha těchto mikroorganismů zajišťuje zdravou pleť. Pokud je tedy jeden mikroorganismus přítomen méně než ten druhý, může dojít ke vzniku akné [76].

- ***Enterobacter gergoviae***

*Enterobacter gergoviae* je gramnegativní bakterie. Vyskytuje se nejčastěji v půdě a ve vodě. Riziko představuje zejména pro osoby s oslabeným imunitním systémem. Hned po *P. aeruginosa* a *B. cepacia* je nejčastějším kontaminantem kosmetických výrobků. Je rezistentní vůči parabenům, a to díky produkci enzymu PrbA (esteráza, která katalyzuje hydrolýzu esterů) [77].

- ***Bacillus***

Rod *Bacillus* patří mezi grampozitivní sporulující bakterie. Bakterie z tohoto rodu se využívají v medicíně, kde produkují antibiotika. *Bacillus cereus* je kontaminantem zejména potravin a může způsobovat otravu jídlem, která se projevuje nevolností, zvracením a průjmy. Vyskytuje se přirozeně ve vzduchu, v půdě či ve vodě, takže může kontaminovat i kosmetické přípravky. V případě styku s poškozenou pokožkou nebo s očima může způsobovat infekce. *Bacillus subtilis* se přirozeně vyskytuje zejména v půdě. Bakterie z rodu *Bacillus* tvoří endospory, což jsou útvary vznikající při nedostatku výživných látek s účelem zajistit přežití organismu při teplotních extrémech, suchu apod [78, 79].

- ***Kocuria rosea***

*Kocuria rosea* je grampozitivní bakterie kokovitého tvaru. Vyskytuje se přirozeně na kůži člověka a také v prostředí (vzduch, půda, voda). Pro zdravého člověka není patogenní, ale u jedinců s oslabenou imunitou může způsobovat různé infekce, nejčastěji infekci močového ústrojí [80].

- ***Micrococcus luteus***

*Micrococcus luteus* je grampozitivní bakterie kokovitého tvaru. Vyskytuje se v prostředí (voda, půda, vzduch). Také se běžně vyskytuje na lidské kůži, v ústní dutině nebo horních cestách dýchacích a v mléčných a jiných živočišných produktech. Vyvolat onemocnění může především u pacientů s oslabenou imunitou [81].

### **2.7.2 Plísňe a kvasinky**

Plísňe a kvasinky patří do říše Houby. Kvasinky jsou jednobuněčné organismy, které nemají bičík a rozmnožují se nepohlavně zejména pučením. Mohou se rozmnožovat i pomocí pohlavních spor. Plísňe mají dlouhá, rozvětvená vlákna nazývaná hyfy, která dohromady tvoří mycelium. Buněčná stěna plísni a kvasinek je tvořena z polysacharidu chitinu, který je tvořen jednotkami N-acetylglukosaminu. Uvnitř buňky není pouze nukleoid, jako u prokaryotických organismů, ale pravé buněčné jádro, tvořeno dvěma membránami a uvnitř se nachází chromatin, tedy DNA. Prokaryotická buňka obsahuje také několik dalších organel, které jsou od okolí odděleny membránou. Mezi ty patří například ribozomy, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum apod [70].

Plísňe produkují mykotoxiny, což jsou jejich sekundární metabolity, které jsou toxické pro člověka i zvířata. Nejdůležitějšími parametry pro růst plísni jsou obsah vody v produktu a relativní vlhkost okolí. Při dermální expozici způsobují mykotoxiny nemoci, které se nazývají mykotoxikózy. Mezi nejvýznamnější mykotoxiny patří aflatoxiny, ochratoxin a patulin, které produkují plísňe *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium patulum* nebo *Penicillium expansum* [82].

Nejčastějšími kontaminanty v kosmetických produktech jsou kvasinky rodu *Candida* a plísňe rodu *Mucor*, *Aspergillus* nebo *Rhizopus*.

*Candida albicans* je nejčastějším kontaminantem z rodu *Candida*. Způsobuje ústní a genitální houbové infekce, které u osob se sníženou imunitou (například kvůli AIDS či rakovinovým onemocněním) může vést i k úmrtí. Běžně se vyskytuje ve střevech a ústech člověka a za normálních okolností není patogenní [70]. Plísňe kontaminují kosmetické přípravky nejméně, největší problém představují bakterie.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Seznam použitých chemikálií

- Sterilní destilovaná voda
- Živný bujón s 1% peptonem M244 (HIMEDIA, Bombai, Indie)
- Agar bakteriologický RM 026 (HIMEDIA, Bomba, Indie)
- Hexam+ (MINASOLVE, Beuvry-La-Forêt, Francie)
- Green OR (MINASOLVE, Beuvry-La-Forêt, Francie)
- Green A (MINASOLVE, Beuvry-La-Forêt, Francie)
- Green B (MINASOLVE, Beuvry-La-Forêt, Francie)

#### 3.2 Seznam použitých pomůcek

- Mikropipety
- Sterilní plastové Petriho misky
- Laboratorní váhy Scaltec SPO61 (Heiligenstadt, Německo)
- Skleněné korkovrty
- Běžné laboratorní sklo (zkumavky, Erlenmayerovy baňky, pipety)
- Bakteriologická klička
- Autokláv Vaposteri (BMT, Brno)
- Inkubátor IP100-U (Biotech, Praha)
- Vortex IKA MS 3 (Německo)

#### 3.3 Použité mikroorganismy

V této bakalářské práci bylo testováno 6 mikroorganismů, z toho jedna gramnegativní bakterie (*Serratia marcescens*), čtyři grampozitivní bakterie (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Kocuria rosea*, *Micrococcus luteus*) a jedna kvasinka (*Candida vini*). Všechny mikroorganismy pocházely z České sbírky mikroorganismů v Brně. Bakterie byly kultivovány v živném bujonu Nutrient Broth w/ 1% Peptone firmy HIMEDIA 24 hodin při 30°C, kvasinky v glukózovém bujonu.

#### 3.4 Příprava živného bujonu a kultivačního média

Na přípravu živného bujonu pro bakterie byl použit Nutrient Broth w/ 1% Peptone firmy HIMEDIA. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 2,5 g bujonu a ten se rozpustil ve 100 ml destilované vody. Poté byl rozpipetován do 20 zkumavek po 5 ml a zkumavky s bujonem se vysterilizovaly. Tyto bujony byly poté používány ke kultivaci vybraných mikroorganismů. Bujon pro kvasinky byl připraven rozpuštěním 2 g glukózy, 0,25 g peptonu a 0,25 g kvasničného extraktu v 50 ml destilované vody.

Na přípravu živné půdy pro bakterie byl použit Nutrient Broth w/ 1% Peptone (složení viz Tabulka č. 2) a Agar powder, bacteriological firmy HIMEDIA. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 5 g bujónu a 4 g agaru, poté bylo přidáno 200 ml destilované vody a tento roztok se sterilizoval v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 101,3 kPa po dobu 20 minut.

Živná půda pro kvasinky byla připravena z Malt Extract Agar Base (složení viz Tabulka č. 3) firmy HIMEDIA. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 10 g tohoto média, poté bylo přidáno 200 ml vody a po rozpuštění se roztok sterilizoval v autoklávu při stejných podmínkách, jako živná půda pro bakterie.

**Tabulka č. 2:** Složení živného bujónu

Složka	Obsah (g·l <sup>-1</sup> )
Pepton A	10
Hovězí extrakt	10
Chlorid sodný	5

**Tabulka č. 3:** Složení živné půdy pro kvasinky

Složka	Obsah (g·l <sup>-1</sup> )
Sladový extrakt	30
Mykologický pepton	5
Agar	15

### 3.5 Příprava testovaných konzervantů

Vzorky konzervantů firmy MinaSolve byly zředěny na 1 %. Přípravek Hexam+ má maximální povolenou koncentraci 1 %, a tak byla tato koncentrace zvolena pro všechny vzorky z důvodu objektivnějšího vyhodnocení. Do zkumavky bylo napepito 0,1 ml konzervantu a 9,9 ml sterilní destilované vody.

**Tabulka č. 4:** Složení použitých konzervantů

Konzervační látka	Složení
E-LEEN Green A	pentylenglykol, fenylpropanol
E-LEEN Green OR	pentylenglykol, extrakt z pomerančovníku hořkého, mandarinky a kůry pomeranče, kyselina askorbová, kyselina citronová
MinaSolve Green B	pentylenglykol, kyselina benzoová, benzoát sodný
MinaSolve Hexam+	pentylenglykol, hexamidin diisethionát

### 3.6 Ověření antimikrobiální aktivity

Pro ověření antimikrobiální aktivity vzorků byla použita jamková difuzní metoda. Tato metoda slouží pro stanovení citlivosti určitého kmene k testované látce – kmen je citlivý anebo rezistentní podle velikosti inhibiční zóny.



**Obrázek 20:** Schéma postupu experimentu

Do 200 ml vysterilizovaného kultivačního média byly napipetovány 2 ml živného bujonu s 24 hodinovou kulturou. Tento roztok byl rozlit do sterilních plastových Petriho misek. Po ztuhnutí byly korkovrtem vytvořeny v každé misce 4 jamky, z toho jedna byla zvolena jako kontrolní. Do jamek bylo pipetováno 100  $\mu$ l 1% vzorků a do poslední, kontrolní, 100  $\mu$ l sterilní destilované vody. Petriho misky se vzorky byly poté kultivovány 72 hodin při 25 °C. Po skončení kultivace byly pravítkem měřeny inhibiční zóny v okolí jamek. Na každou kombinaci mikroorganismus - konzervant byly použity 3 misky, v každé byly 3 jamky s konzervační látkou a každá inhibiční zóna byla měřena dvakrát, tudíž pro jeden mikroorganismus s jednou konzervační látkou bylo naměřeno celkem 18 hodnot inhibičních zón, ze kterých byla vypočítána průměrná hodnota inhibiční zóny včetně směrodatné odchylky (**Tabulka č. 5**).



## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Za účelem ověření antimikrobiální aktivity přírodně identických konzervantů firmy MinaSolve proti vybraným mikroorganismům byla použita jamková difuzní metoda. Vybrány byly mikroorganismy *Serratia marcescens*, *Kocuria rosea*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* a *Candida vini*. Testována byla jedna koncentrace všech přípravků a to koncentrace 1%.

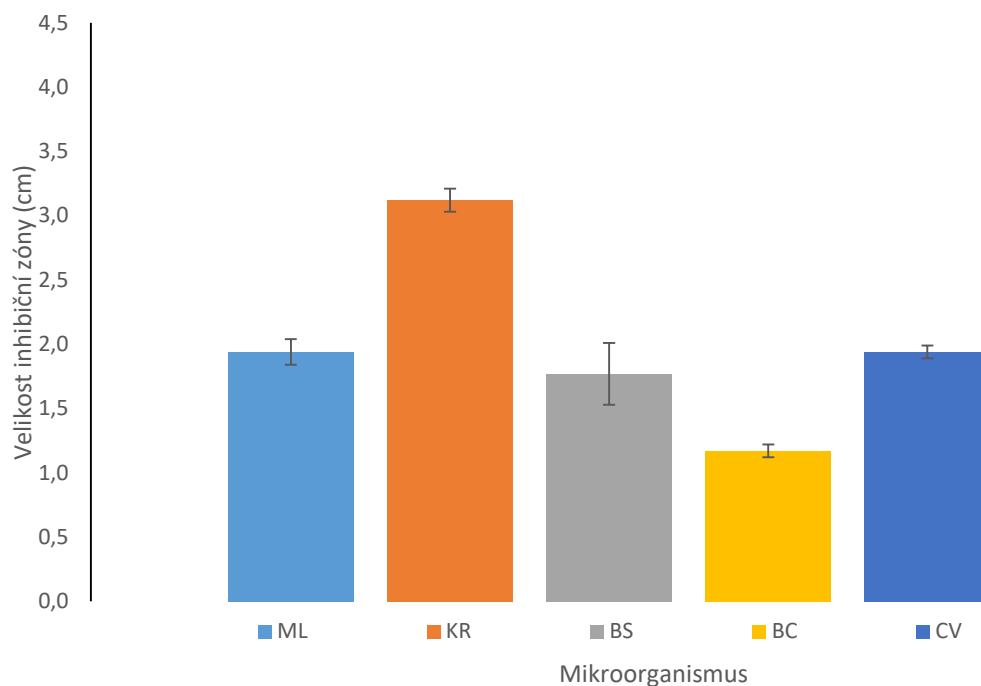
Největší antimikrobiální aktivitu měl na všechny mikroorganismy přípravek Hexam+, v jehož složení nalezneme pentylenglykol spolu s hexamidin diisethionátem. Nejvíce účinný byl proti mikroorganismům *Micrococcus luteus* a *Kocuria rosea*, nejméně účinný potom proti *Bacillus cereus*. Přípravek E-LEEN Green OR, který je složený z citrusových extraktů, kyseliny askorbové, citronové a pentylenglykolu byl nejúčinnější proti *Kocuria rosea* a nejméně účinný proti *Bacillus cereus*. Zbýlé dva přípravky, E-LEEN Green A (pentylenglykol a fenylpropanol) a Green B (pentylenglykol, kyselina benzoová a benzoát sodný), nevykazovaly při použité koncentraci 1 % aktivitu vůči žádnému z vybraných mikroorganismů, je tedy pravděpodobné, že by se tyto přípravky musely použít v koncentraci vyšší - E-LEEN Green A je možno použít do koncentrace 3 %, Green B do koncentrace 5 %.

Odchytky vznikly z toho důvodu, že inhibiční zóny neměly ostré ohraničení a tak nebylo možné s jistotou změřit jejich velikosti. Mohly vzniknout také měření zón pravítkem, protože bylo možné s přesností měřit pouze na jedno desetinné místo. Aby chyba byla co nejvíce eliminována, bylo měřeno u každé kombinace mikroorganismus-konzervant 18 hodnot.

Výsledky jsou přehledně shrnuty v následující tabulce (**Tabulka č.5**) a grafech (**Graf č. 1 a 2**). Inhibiční zóny jsou znázorněny na fotografiích (**Obrázek č. 21 – 26**).

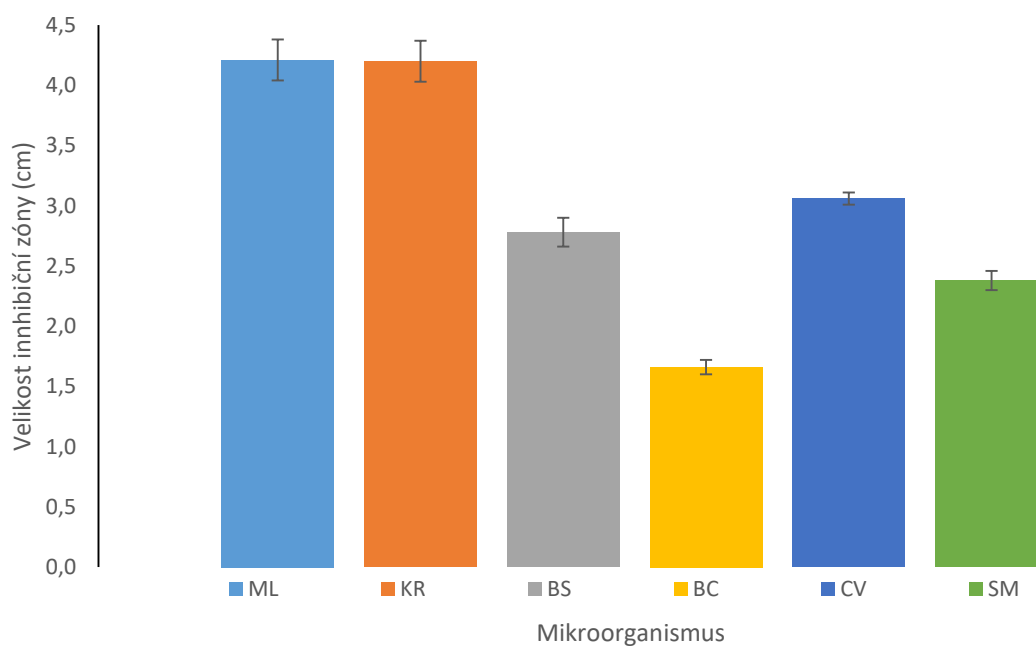
**Tabulka č. 5:** Velikosti inhibičních zón testovaných přípravků

MO	Inhibiční zóny (cm)			
	Green OR	Hexam+	Green B	Green A
<i>Micrococcus luteus</i>	1,94 ± 0,10	4,21 ± 0,17	x	x
<i>Kocuria rosea</i>	3,12 ± 0,09	4,20 ± 0,17	x	x
<i>Bacillus subtilis</i>	1,77 ± 0,24	2,78 ± 0,12	x	x
<i>Bacillus cereus</i>	1,17 ± 0,05	1,66 ± 0,06	x	x
<i>Serratia marcescens</i>	x	2,38 ± 0,08	x	x
<i>Candida vini</i>	1,94 ± 0,05	3,06 ± 0,05	x	x



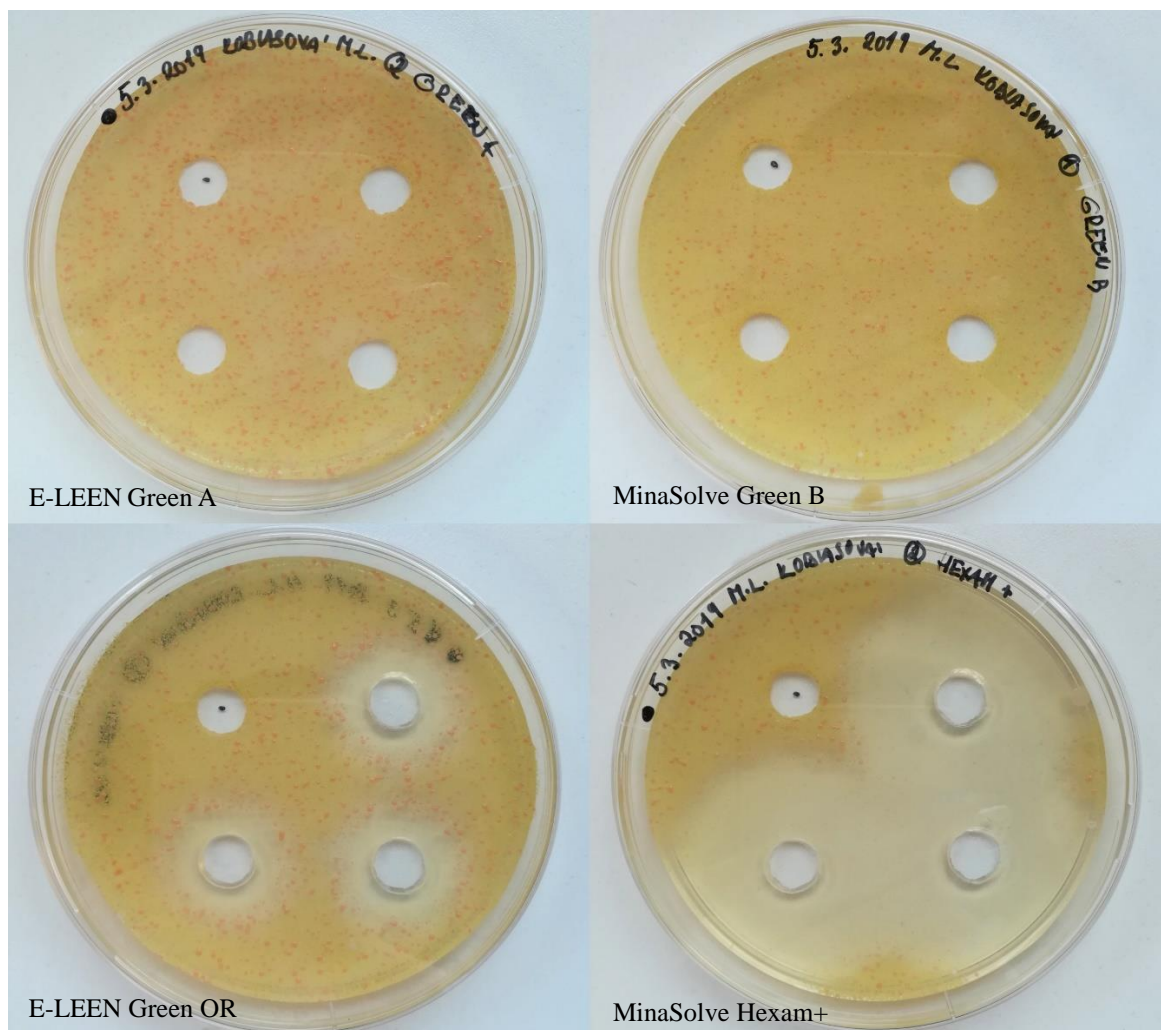
**Graf č. 1:** Srovnání velikostí inhibičních zón přípravku Green OR.

*ML – Micrococcus luteus, KR – Kocuria rosea, BS – Bacillus subtilis, BC – Bacillus cereus, CV – Candida vini*



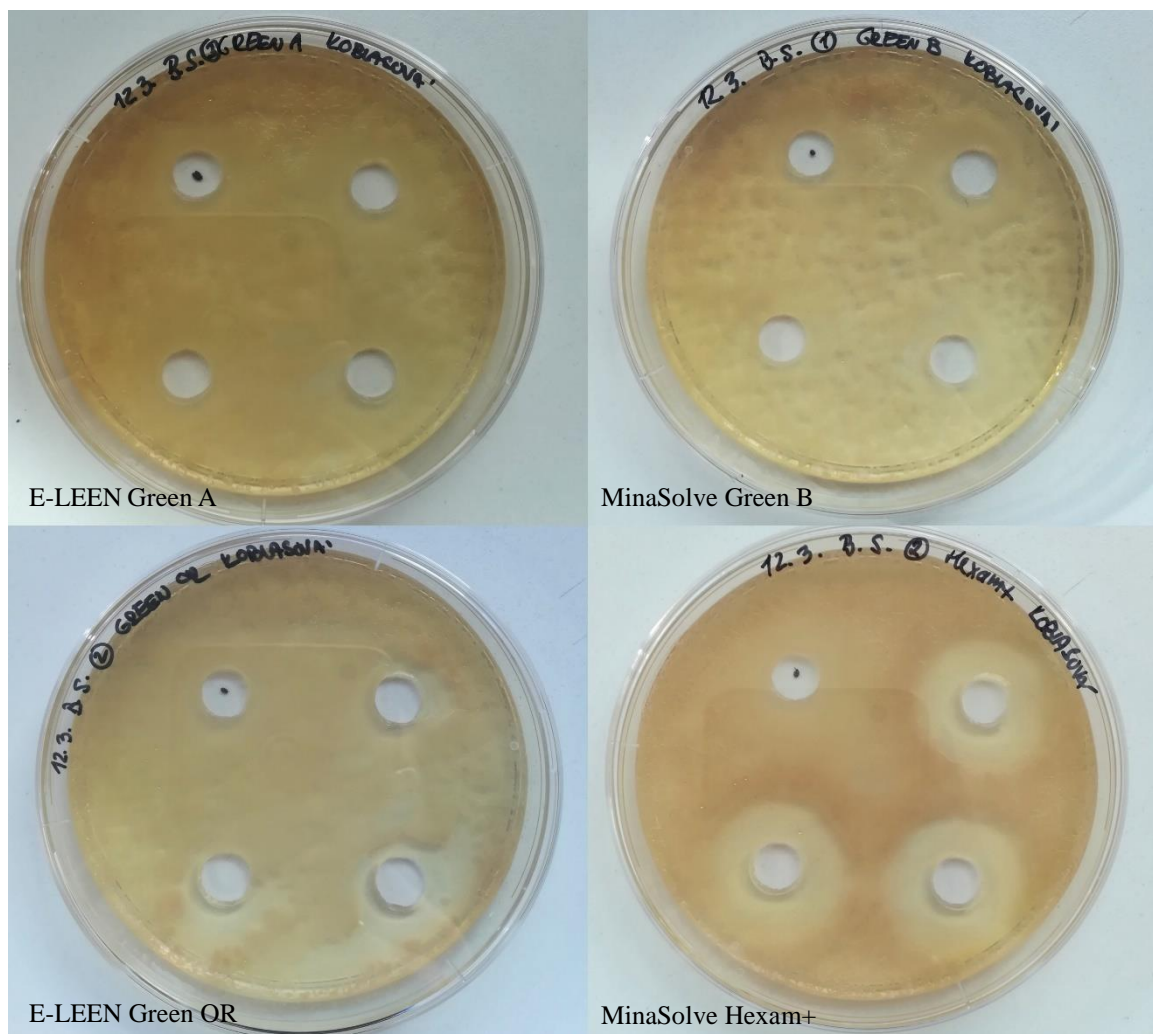
**Graf č. 2:** Srovnání velikostí inhibičních zón přípravku Hexam+.

*ML – Micrococcus luteus, KR – Kocuria rosea, BS – Bacillus subtilis, BC – Bacillus cereus, CV – Candida vini, SM – Serratia marcescens*



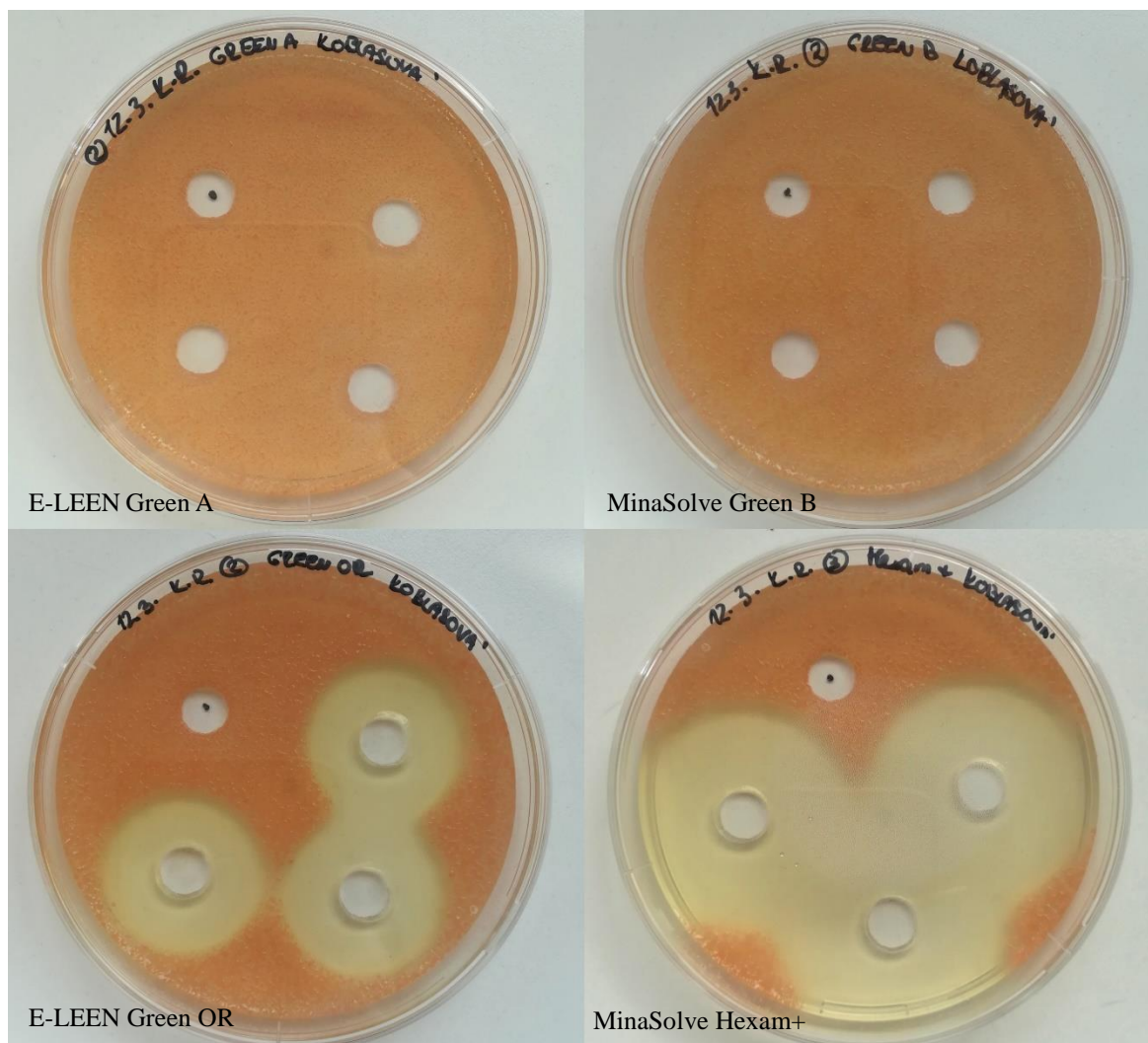
**Obrázek 21:** Inhibiční zóny všech testovaných přípravků na *Micrococcus luteus*, vlevo nahoře kontrolní vzorek

E-LEEN Green A a E-LEEN Green B nevykazují proti *Micrococcus luteus* při testované koncentraci 1 % žádnou aktivitu, největší aktivitu vykazuje přípravek Hexam+.



**Obrázek 22:** Inhibiční zóny všech testovaných přípravků na *Bacillus subtilis*, vlevo nahoře kontrolní vzorek

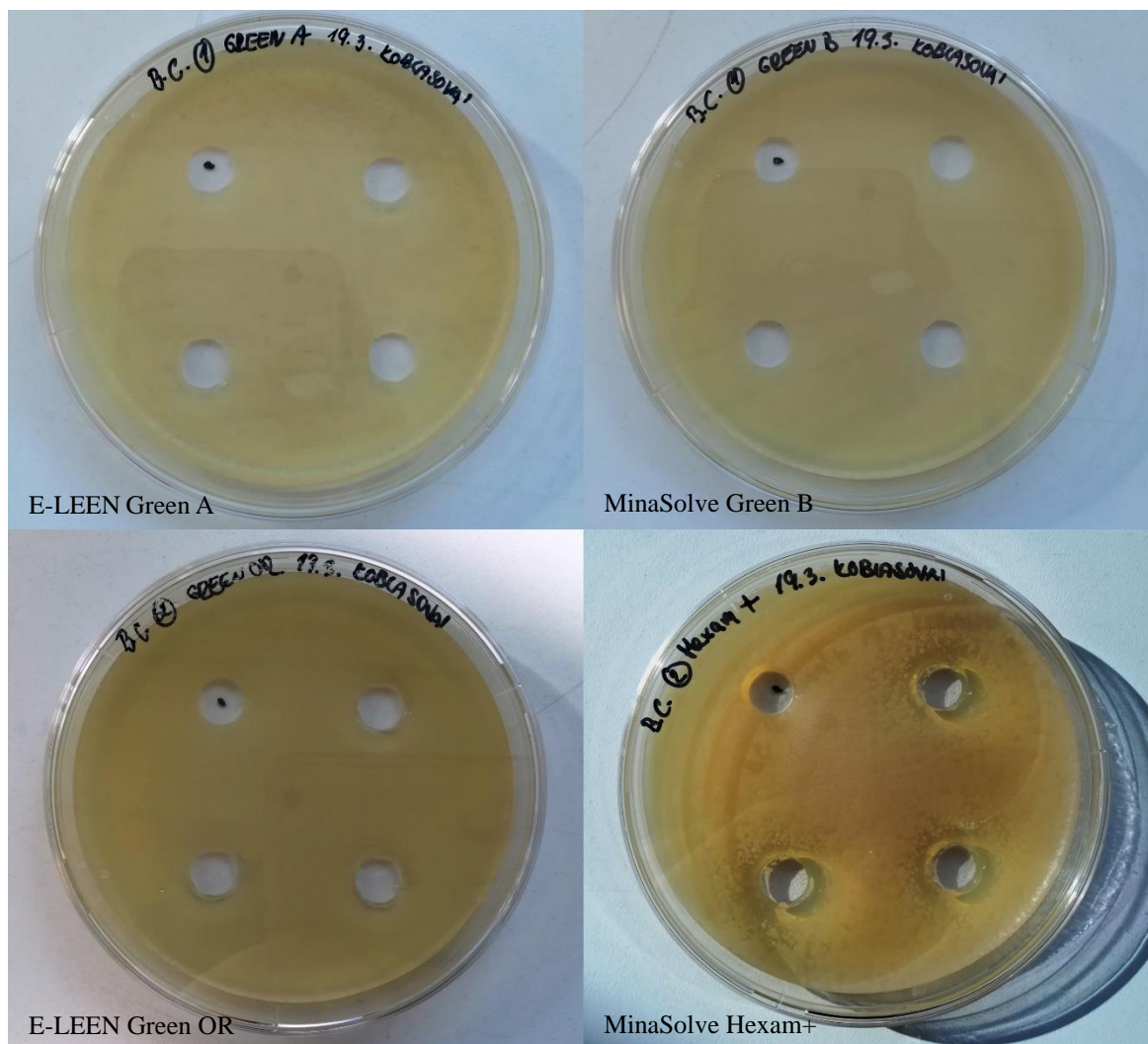
E-LEEN Green A a E-LEEN Green B nevykazují proti *Bacillus subtilis* při testované koncentraci 1 % žádnou aktivitu, největší aktivitu vykazuje přípravek Hexam+, avšak menší než u *Micrococcus luteus*.



**Obrázek 23:** Inhibiční zóny všech testovaných přípravků na *Kocuria rosea*, vlevo nahoře kontrolní vzorek

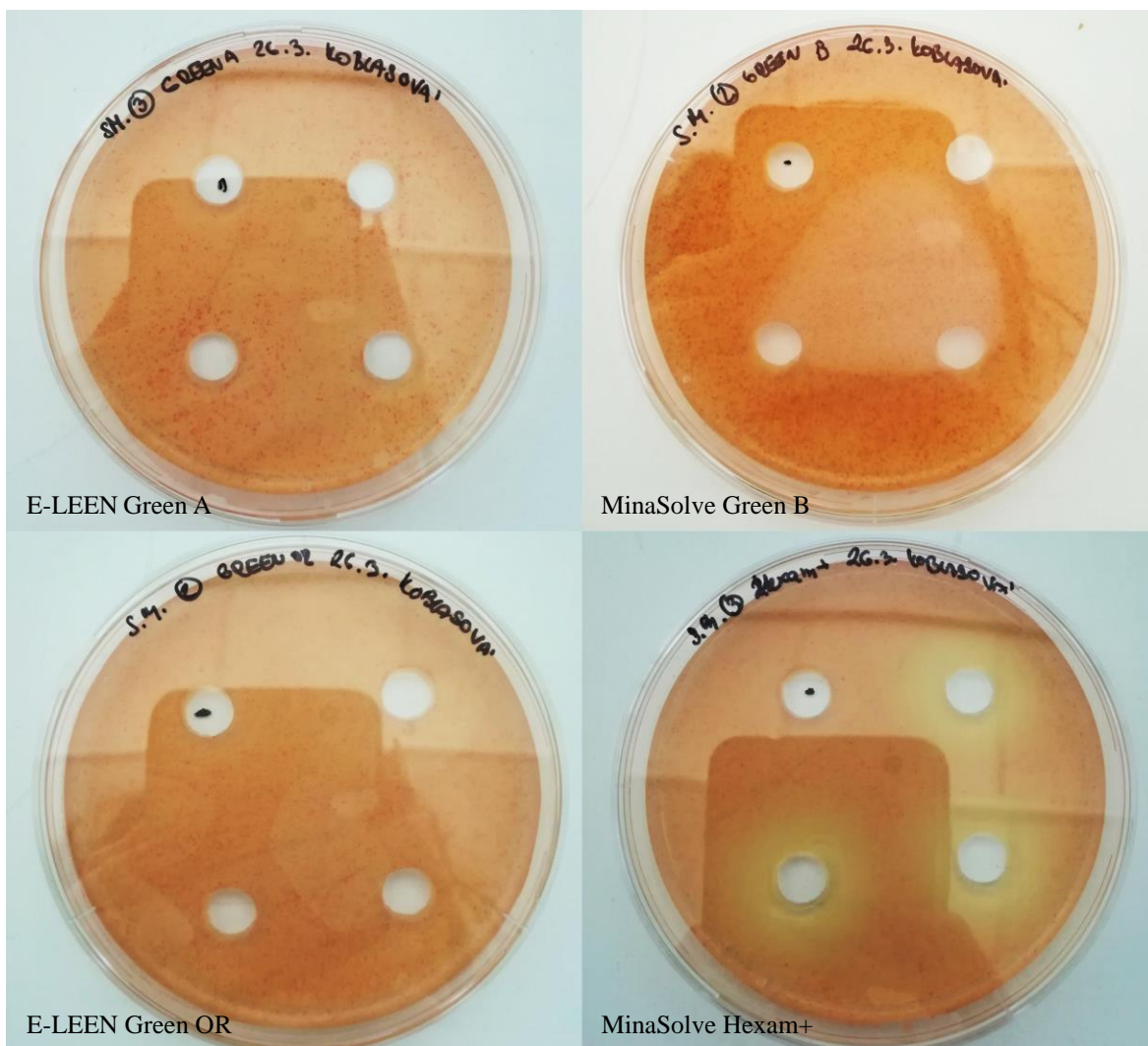
E-LEEN Green A a E-LEEN Green B nevykazují proti *Kocuria rosea* při testované koncentraci 1 % žádnou aktivitu, největší aktivitu vykazuje přípravek Hexam+.





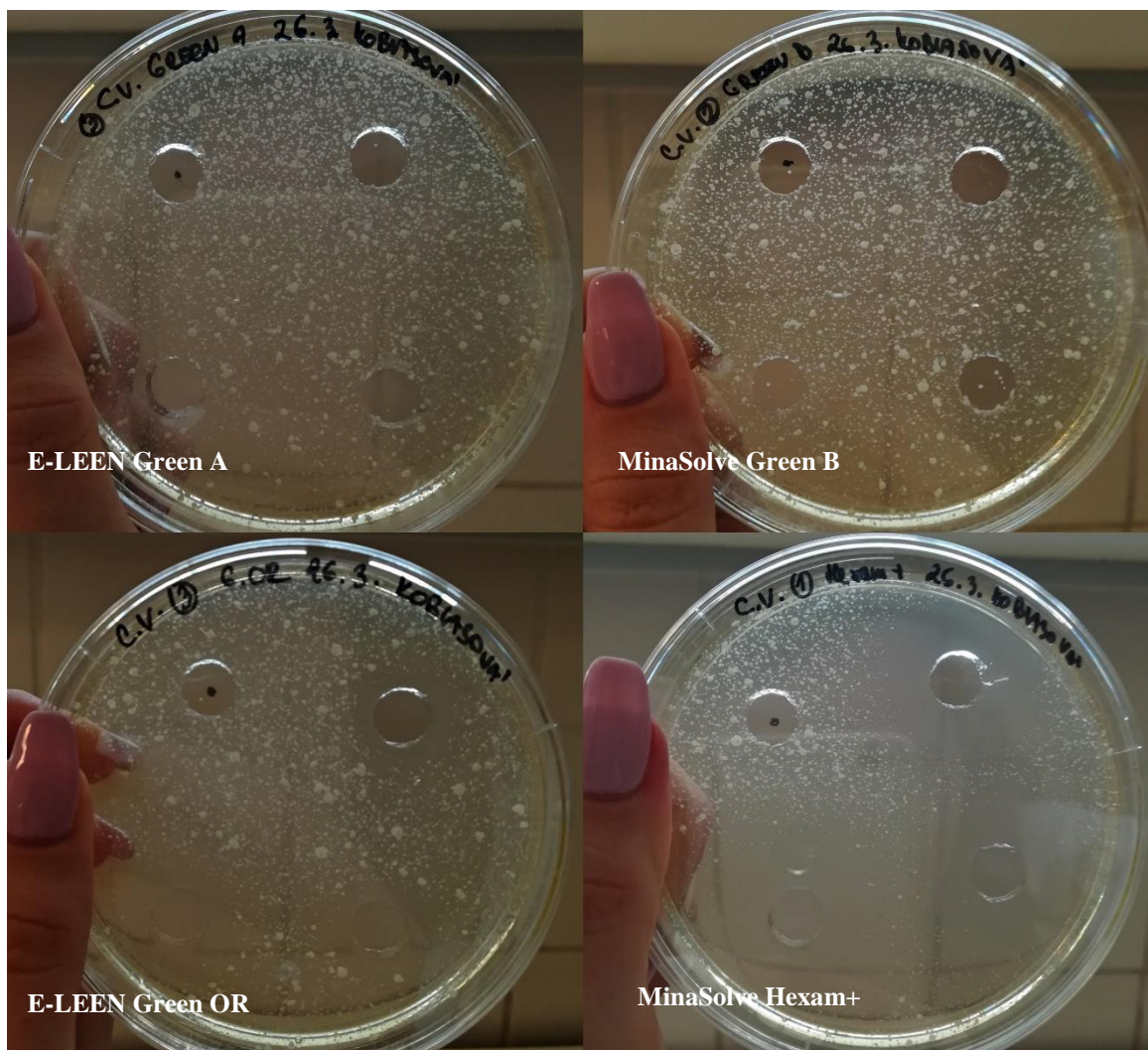
**Obrázek 24:** Inhibiční zóny všech testovaných přípravků na *Bacillus cereus*, vlevo nahoře kontrolní vzorek

E-LEEN Green A a MinaSolve Green B nevykazují žádnou aktivitu proti *Bacillus cereus* při testované koncentraci 1 %, E-LEEN Green OR vykazuje jen minimální aktivitu, která na fotografii nebyla možná zachytit, přípravek Hexam+ vykazoval aktivitu největší. Ze všech testovaných mikroorganismů je *Bacillus cereus* neojdolnější.



**Obrázek 25:** Inhibiční zóny všech testovaných přípravků na *Serratia marcescens*, vlevo nahoře kontrolní vzorek

E-LEEN Green A, MinaSolve Green B a E-LEEN Green OR nevykazují proti *Serratia marcescens* při testované koncentraci 1 % žádnou aktivitu, přípravek Hexam+ vykazoval aktivitu největší.



**Obrázek 26:** Inhibiční zóny všech testovaných přípravků na *Candida vini*, vlevo nahoře kontrolní vzorek

E-LEEN Green A a MinaSolve Green B nevykazují proti *Candida vini* při testované koncentraci 1 % žádnou aktivitu, přípravek Hexam+ vykazoval aktivitu největší.



## 5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zpracování problematiky trvanlivosti a konzervace kosmetických přípravků, přírodní kosmetiky a specifik její konzervace, dále vypracování přehledu nejčastěji používaných systémů a nových trendů a nakonec ověření antimikrobiální aktivity vybraných přírodně identických konzervantů vůči vybraným mikroorganismům, kterými v rámci této bakalářské práce byly čtyři grampozitivní bakterie (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Kocuria rosea* a *Micrococcus luteus*) jedna gramnegativní bakterie (*Serratia marcescens*) a jedna kvasinka (*Candida vini*).

Mikrobiální kontaminace v kosmetice představuje významné riziko pro zdraví spotřebitele, protože kontaminované přípravky mohou vést k podráždění nebo infekci, zvláště při jejich aplikaci na citlivou či poškozenou pokožku. Proto je nutné kosmetické výrobky dostatečně chránit konzervačními zákroky, mezi které patří použití chemických konzervačních látek.

Konzervanty používané v kosmetice se rozdělují na přírodní, přírodně identické a syntetické. Konzervanty přírodně identického a syntetického původu patří mezi nepoužívanější. Nejvýznamnějšími a nejčastěji používanými konzervanty jsou parabeny (alkylestery kyseliny parahydroxybenzoové), alkoholy jako fenoxylethanol či benzylalkohol, sloučeniny isothiazolinonu nebo donory formaldehydu. Mezi přírodní konzervanty používané v kosmetice se řadí hlavně esenciální oleje, které vykazují široké antimikrobiální vlastnosti. Mezi ně patří například skořicová silice, hřebíčkový olej, levandulový olej nebo například známý tea tree olej.

V experimentální části byly testovány čtyři přírodně identické konzervanty firmy MinaSolve, která vyrábí konzervační látky a také jiné přísady do kosmetiky cestou šetrnou k životnímu prostředí i ke zdraví spotřebitele. Základem všech konzervačních látek MinaSolve je pentylenglykol, vyrobený využitím odpadních surovin ze zpracování cukrové třtiny a kukuřičných klasů. Testovány byly přípravky E-LEEN Green A, který je složen z pentylenglykolu a fenylpropanolu, E-LEEN Green OR, který je směsí citrusových extraktů, kyseliny citronové, askorbové a pentylenglykolu, Green B, složen z kyseliny benzoové, benzoátu sodného a pentylenglykolu a Hexam+, který obsahuje hexamidin diisethionát a pentylenglykol. Všechny přípravky byly testovány v koncentraci 1 %.

Z porovnání naměřených inhibičních zón je zřejmé, že nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazoval přípravek Hexam+, u něhož byly naměřeny nejvyšší hodnoty inhibičních zón, konkrétně  $4,21 \pm 0,17$  cm u *Micrococcus luteus* a  $4,20 \pm 0,17$  cm *Kocuria rosea*. Nejnížší aktivitu vykazoval přípravek E-LEEN Green OR, u kterého nejvyšší hodnota inhibiční zóny činila  $3,12 \pm 0,09$  cm u mikroorganismu *Kocuria rosea*. E-LEEN Green A a Green B nevykazovaly při použité koncentraci 1 % aktivitu vůči žádnému z testovaných mikroorganismů. Z tohoto vyplývá, že ze všech mikroorganismů, testovaných v této práci, jsou nejodolnější proti všem přípravkům mikroorganismy *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*, nejméně odolnými potom jsou *Micrococcus luteus* a *Kocuria rosea*.

U přípravků, které nevykazovaly žádnou aktivitu (E-LEEN Green A a MinaSolve Green B) by řešením mohlo být například použití vyšší koncentrace (E-LEEN Green A je možno použít do koncentrace 3 %, Green B do koncentrace 5 %) nebo použití těchto přípravků v kombinaci s jinými látkami, které mají antimikrobiální vlastnosti. Použití chemických látek také není jediným způsobem ochrany před mikrobiální kontaminací. Je možné například v některém z technologických kroků při výrobě použít ošetření zvýšenou teplotou. Možným řešením je také produkty plnit do obalů, které minimalizují sekundární kontaminaci, tedy kontaminaci spotřebitelem (například plnění pleťového krému do tuby místo do kelímku).

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ALVAREZ-RIVERA, Gerardo, Maria LLOMPART, Marta LORES a Carmen GARCIA JARES, 2018. Preservatives in Cosmetics. Analysis of Cosmetic Products. Elsevier, 2018, 175-224. DOI: 10.1016/B978-0-444-63508-2.00009-6. ISBN 9780444635082. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444635082000096>
- [2] DAO, Huy, Prit LAKHANI, Anitha POLICE, et al., 2018. Microbial Stability of Pharmaceutical and Cosmetic Products. AAPS PharmSciTech. 19(1), 60-78. DOI: 10.1208/s12249-017-0875-1. ISSN 1530-9932. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1208/s12249-017-0875-1>
- [3] BRANNAN, Daniel K. *Cosmetic Microbiology: A practical handbook*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 1997. ISBN 0849337135
- [4] PRABUSEENIVASAN, Seenivasan, Manickkam JAYAKUMAR a Savarimuthu IGNACIMUTHU, 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine. 6(1). DOI: 10.1186/1472-6882-6-39. ISSN 14726882. Dostupné také z: <http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-6-39>
- [5] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích, In: Česká Republika. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX%3A32009R1223>
- [6] DREYFUSS, Lise, 2018. Cosmetic Products. Methods in Consumer Research, Volume 2. Elsevier, 2018, 397-410. DOI: 10.1016/B978-0-08-101743-2.00016-9. ISBN 9780081017432. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081017432000169>
- [7] Labeling of Cosmetic Products, 2018. Cosmetics. 5(1). DOI: 10.3390/cosmetics5010022. ISSN 2079-9284. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2079-9284/5/1/22>
- [8] ČSN EN ISO 17516, *Kosmetika – Mikrobiologie – Mikrobiologické limity*, 2014.
- [9] MIRALLES, Pablo, Alberto CHISVERT, M. José ALONSO, Sandra HERNANDORENA a Amparo SALVADOR, 2018. Determination of free formaldehyde in cosmetics containing formaldehyde-releasing preservatives by reversed-phase dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography with post-column derivatization. Journal of Chromatography A. 1543, 34-39. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.02.031. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967318302139>
- [10] PAYE, M., BAREL, A.O., MAIBACH, H.I. Handbook of Cosmetic Science and Technology. 2nd edition. New York, USA: Taylor & Francis, 2006. 1003 p. ISBN 1-57444-824-2.
- [11] SALVADOR, Amparo a Alberto CHISVERT, 2007. Analysis of cosmetic products. London: Elsevier. ISBN 978-0-444-52260-3.

- [12] Formaldehyd, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA) [cit. 2019-04-12].  
Dostupné také z: <https://sk.wikipedia.org/wiki/Formaldehyd#/media/File:Formaldehyd-e-2D.svg>
- [13] DE GROOT, Anton C., Ian R. WHITE, Mari-Ann FLYVHOLM, Gerda LENSEN a Pieter-Jan COENRAADS, Formaldehyde-releasers in cosmetics: relationship to formaldehyde contact allergy. DOI: 10.1111/j.1600-0536.2009.01615.x. ISBN 0105-1873. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0536.2009.01615.x>
- [14] Imidazolidinylurea, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA) [cit. 2019-04-12].  
Dostupné z: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/97/Imidazolidinyl\\_urea\\_erroneous\\_formula.png/800pxImidazolidinyl\\_urea\\_erroneous\\_formula.png?1542623261610](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/97/Imidazolidinyl_urea_erroneous_formula.png/800pxImidazolidinyl_urea_erroneous_formula.png?1542623261610)
- [15] Diazolidinylurea, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA) [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/19/Diazolidinyl\\_urea\\_erroneous\\_formula.png/220px-Diazolidinyl\\_urea\\_erroneous\\_formula.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/19/Diazolidinyl_urea_erroneous_formula.png/220px-Diazolidinyl_urea_erroneous_formula.png)
- [16] Benzylhemiformal, In: *Pubchem* [online]. [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/\\_Benzyloxy\\_methanol](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/_Benzyloxy_methanol)
- [17] Bronopol, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA) [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Bronopol#/media/File:Bronopol\\_skeletal.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Bronopol#/media/File:Bronopol_skeletal.svg)
- [18] DMDM Hydantoin, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA) [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/DMDM\\_hydantoin#/media/File:DMDM\\_hydantoin.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/DMDM_hydantoin#/media/File:DMDM_hydantoin.svg)
- [19] Quaternium 15, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA) [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Quaternium-15#/media/File:Undefined\\_Quaternium-15.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Quaternium-15#/media/File:Undefined_Quaternium-15.png)
- [20] CHOI, Seul Min, Tae Hyun ROH, Duck Soo LIM, Sam KACEW, Hyung Sik KIM a Byung-Mu LEE, Risk assessment of benzalkonium chloride in cosmetic products. DOI: 10.1080/10937404.2017.1408552. ISBN 1093-7404. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10937404.2017.1408552>
- [21] Benzalkonium chlorid, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA) [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Benzalkoniumchlorid#/media/File:Benzalkonium\\_chloride\\_Structure\\_V.1.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Benzalkoniumchlorid#/media/File:Benzalkonium_chloride_Structure_V.1.svg)
- [22] LIU, T. a D. WU, High-performance liquid chromatographic determination of triclosan and triclocarban in cosmetic products. DOI: 10.1111/j.1468-2494.2012.00742.x. ISBN 0142-5463. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-2494.2012.00742.x>
- [23] Triclosan, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA) [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Triclosan#/media/File:Triclosan.svg>

- [24] GARCÍA-GAVÍN, Juan, Sara VANSINA, Stefan KERRE, Alix NAERT a An GOOSSENS, Methylisothiazolinone, an emerging allergen in cosmetics?. DOI: 10.1111/j.1600-0536.2010.01754.x. ISBN 0105-1873. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0536.2010.01754.x>
- [25] Methylisothiazolinon, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA) [cit. 2019- 04- 12]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Methylisothiazolinon#/media/File:Methylisothiazolinone.svg>
- [26] Methylchloroisothiazolinon, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA) [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Methylchloroisothiazolinone#/media/File:Methylchloroisothiazolinone\\_structure.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Methylchloroisothiazolinone#/media/File:Methylchloroisothiazolinone_structure.svg)
- [27] DEHYDROACETIC ACID [online], [cit. 2018-10-13]. Dostupné z: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~1QuNQ:3>
- [28] SORBIC ACID [online], [cit. 2018-10-13]. Dostupné z: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~FJFhHY:1>
- [29] FIUME, Monice M., Bart A. HELDRETH, Wilma F. BERGFELD, et al., 2014. Safety Assessment of Citric Acid, Inorganic Citrate Salts, and Alkyl Citrate Esters as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*. 33(2\_suppl), 16S-46S. DOI: 10.1177/1091581814526891. ISSN 1091-5818. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1091581814526891>
- [30] Propionic Acid [online], [cit. 2018-10-13]. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/propionic\\_acid#section=Pharmacology](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/propionic_acid#section=Pharmacology)
- [31] Kyselina benzoová, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA) [cit. 2019- 04- 12]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_benzoov%C3%A1#/media/File:Benzoic-acid.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_benzoov%C3%A1#/media/File:Benzoic-acid.svg)
- [32] Benzoic Acid [online], [cit. 2018-10-13]. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzoic\\_acid#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzoic_acid#section=Top)
- [33] Parabeny, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA) [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Parabeny#/media/File:Paraben-2D-skeletal.png>
- [34] SONI, M.G., I.G. CARABIN a G.A. BURDOCK, 2007. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 32(6), 567-572. DOI: 10.1016/j.fct.2005.01.020. ISBN 0278-6915. ISSN 0269-4727. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691505000530>
- [35] PAŽOUREKOVÁ, Silvia, Jarmila HOJEROVÁ a Lora TODORCHEVSKA, 2018. Mýty a pravdy o parabenech v kosmetice. *Dermarevue*. Bratislava, 2018(1), 15-17. ISSN 1335-7360
- [36] LILIENBLUM, Werner, Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) – Final version of the opinion on Phenoxyethanol in cosmetic products. DOI: 10.1016/j.yrtph.2016.11.007. ISBN 0273-2300. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230016303282>
- [37] KARABIT, M. S., O. T. JUNESKANS a P. LUNDGREN, STUDIES ON THE EVALUATION OF PRESERVATIVE EFFICACY—II. THE DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL CHARACTERISTICS OF BENZYLALCOHOL. DOI:

- 10.1111/j.1365-2710.1986.tb00853.x. ISBN 0269-4727. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2710.1986.tb00853.x>
- [38] Fenoxýethanol, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA) [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Fenoxýethanol#/media/File:2-phenoxyethanol-Line-Structure.svg>
- [39] FLANAGAN, James, Preserving Cosmetics with Natural Preservatives and Preserving Natural Cosmetics. 2011-06-06. DOI: 10.1002/9781118056806.ch10. ISBN 978-111-8056-806. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118056806.ch10>
- [40] DARBRE, P. D., A. ALJARRAH, W. R. MILLER, N. G. COLDHAM, M. J. SAUER a G. S. POPE, 2004. Concentrations of parabens in human breast tumours. *Journal of Applied Toxicology*. **24**(1), 5-13. DOI: 10.1002/jat.958. ISSN 0260-437X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.958>
- [41] KOČEVAR GLAVAČ, N. a M. LUNDER, Preservative efficacy of selected antimicrobials of natural origin in a cosmetic emulsion. DOI: 10.1111/ics.12461. ISBN 0142-5463. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ics.12461>
- [42] MUYIMA, N. Y. O., G. ZULU, T. BHENGU a D. POPPLEWELL, The potential application of some novel essential oils as natural cosmetic preservatives in an aqueous cream formulation. *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL*. 2002(17), 258-266. DOI: 10.1002/ffj.1093. ISBN 0882-5734. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1093>
- [43] SWAMY, Mallappa Kumara, Mohd Sayeed AKHTAR a Uma Rani SINNIHA, Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016. DOI: 10.1155/2016/3012462. ISBN 1741-427X. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2016/3012462/>
- [44] UNLU, Mehmet, Emel ERGENE, Gulhan Vardar UNLU, Hulya Sivas ZEYTINOGLU a Nilufer VURAL, 2010. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology*. 48(11), 3274-3280. DOI: 10.1016/j.fct.2010.09.001. ISSN 02786915. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691510005648>
- [45] NOVY, Pavel, Hana DAVIDOVA, Cecilia Suqued SERRANO-ROJERO, Johana RONDEVALDOVA, Josef PULKRABEK a Ladislav KOKOSKA, Composition and Antimicrobial Activity of *Euphrasia rostkoviana* Hayne Essential Oil. DOI: 10.1155/2015/734101. ISBN 1741-427X. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/734101/>
- [46] BOUYAHYA, Abdelhakim, Abdeslam ET-TOUYS, Youssef BAKRI, Ahmed TALBAUI, Hajiba FELLAH, Jamal ABRINI a Nadia DAKKA, Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.08.015. ISBN 0882-4010. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401017305818>

- [47] POLITEO, Olivera, Mejra BEKTAŠEVIĆ, Ivana CAREV, Mladenka JURIN a Marin ROJE, 2018. Phytochemical Composition, Antioxidant Potential and Cholinesterase Inhibition Potential of Extracts from *Mentha pulegium* L. 15(12). DOI: 10.1002/cbdv.201800374. ISSN 16121872. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbdv.201800374>
- [48] HAMMER, Katherine A., Christine F. CARSON a Thomas V. RILEY, Effects of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Essential Oil and the Major Monoterpene Component Terpinen-4-ol on the Development of Single- and Multistep Antibiotic Resistance and Antimicrobial Susceptibility. DOI: 10.1128/aac.05741-11. ISBN 0066-4804. Dostupné také z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.05741-11>
- [49] CASARIN, Maísa, Josiele PAZINATTO, Roberto Christ Vianna SANTOS a Fabricio Batistin ZANATTA, 2018. *Melaleuca alternifolia* and its application against dental plaque and periodontal diseases: A systematic review. *Phytotherapy Research*. 32(2), 230-242. DOI: 10.1002/ptr.5974. ISSN 0951418X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.5974>
- [50] BERKA-ZOUGALI, Baya, Mohamed-Amine FERHAT, Aicha HASSANI, Farid CHEMAT a Karim S. ALLAF, Comparative Study of Essential Oils Extracted from Algerian *Myrtus communis* L. Leaves Using Microwaves and Hydrodistillation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012(13). DOI: 10.3390/ijms13044673. ISBN 1422-0067. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/4/4673>
- [51] RUNYORO, D., O. NGASSAPA, K. VAGIONAS, N. ALIGIANNIS, K. GRAIKOU a I. CHINO, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.06.028. ISBN 0308- 8146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609008401>
- [52] STANOJEVIC, Ljiljana P., Zeljka R. MARJANOVIC-BALABAN, Vesna D. KALABA, Jelena S. STANOJEVIC, Dragan J. CVETKOVIC a Milorad D. CAKIC, 2018. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Essential Oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 20(6), 1557-1569. DOI: 10.1080/0972060X.2017.1401963. ISSN 0972-060X. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/0972060X.2017.1401963>
- [53] ESEN, Gülden, Ayse Dilek AZAZ, Mine KURKCUOGLU, Kemal Husnu Can BASER a Ahmet TINMAZ, Essential oil and antimicrobial activity of wild and cultivated *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) letsvaart from the Marmara region, Turkey. DOI: 10.1002/ffj.1808. ISBN 0882-5734. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1808>
- [54] TALEB, Mohammed, Nourtan ABDELTAWAB, Rehab SHAMMA, Sherein ABDELGAYED, Sarah MOHAMED, Mohamed FARAG a Mohammed RAMADAN, 2018. *Origanum vulgare* L. Essential Oil as a Potential Anti-Acne Topical Nanoemulsion—In Vitro and In Vivo Study. *Molecules*. 23(9). DOI: 10.3390/molecules23092164. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/9/2164>

- [55] RAZIEH, Ahmadi, Alizadeh ARDALAN a Ketabchi SAGHAR, 2015. Antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus kotschyanus* grown wild in Iran. *International Journal of Biosciences (IJB)*. 6(3), 239-248. DOI: 10.12692/ijb/6.3.239-248. ISSN 22206655. Dostupné také z: <http://www.innspub.net/wp-content/uploads/2015/02/IJB-V6No3-p239-248.pdf>
- [56] CUTILLAS, Ana-Belen, Alejandro CARRASCO, Ramiro MARTINEZ-GUTIERREZ, Virginia TOMAS a Jose TUDELA, 2018. *Rosmarinus officinalis* L. essential oils from Spain: composition, antioxidant capacity, lipoxygenase and acetylcholinesterase inhibitory capacities, and antimicrobial activities. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 152(6), 1282-1292. DOI: 10.1080/11263504.2018.1445129. ISSN 1126-3504. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/11263504.2018.1445129>
- [57] FIUME, Monice M., Wilma F. BERGFELD, Donald V. BELSITO, et al., 2018. Safety Assessment of *Rosmarinus officinalis* (Rosemary)-Derived Ingredients as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*. 37(3\_suppl), 12S-50S. DOI: 10.1177/1091581818800020. ISSN 1091-5818. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1091581818800020>
- [58] CHAIEB, Kamel, Hafedh HAJLAOUI, Tarek ZMANTAR, Amel Ben KAHLA-NAKBI, Mahmoud ROUABHIA, Kacem MAHDOUANI a Amina BAKHROUF, 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*. 21(6), 501-506. DOI: 10.1002/ptr.2124. ISSN 0951418X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2124>
- [59] Minasolve [online]. [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <https://minasolve.com/product/>
- [60] SHEN, Chun-Yan, Jian-Guo JIANG, Wei ZHU a Qin OU-YANG, 2017. Anti-inflammatory Effect of Essential Oil from *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65(39), 8586-8594. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b02586. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.7b02586>
- [61] Final Report on the Safety Assessment of Hexamidine and Hexamidine Diisethionate1, 2016. *International Journal of Toxicology*. 26(3\_suppl), 79-88. DOI: 10.1080/10915810701663168. ISSN 1091-5818. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1080/10915810701663168>
- [62] Hexamidine diisethionate, In: *Pubchem* [online]. [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexamidine\\_diisethionate](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexamidine_diisethionate)
- [63] Ecocert, In: *BIOOO.CZ* [online]. [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: <https://encyklopedie.bioooo.cz/certifikaty/ecocert/>
- [64] Natrue, In: *BIOOO.CZ* [online]. [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: <https://encyklopedie.bioooo.cz/certifikaty/natrue/>
- [65] USDA Organic, In: *BIOOO.CZ* [online]. [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: <https://encyklopedie.bioooo.cz/certifikaty/usda-organic/>



- [66] HALLA, Nouredine, Isabel FERNANDES, Sandrina HELENO, et al., 2018. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. *Molecules*. 23(7). DOI: 10.3390/molecules23071571. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/7/1571>
- [67] SHEN, Xiong, Jian LIANG, Luxia ZHENG, Hong WANG, Zi WANG, Qiuyi JI, Qiaoli CHEN a Qianzhou LV, 2018. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for determination of parabens in human breast tumor and peripheral adipose tissue. *Journal of Chromatography B*. 1096, 48-55. DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.08.004. ISSN 15700232. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157002321830504X>
- [68] HARVEY, Philip W., 2004. Discussion of concentrations of parabens in human breast tumours. *Journal of Applied Toxicology*. 24(4), 307-310. DOI: 10.1002/jat.991. ISSN 0260-437X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.991>
- [69] NOWAK, Karolina, Wioletta RATAJCZAK–WRONA, Maria GÓRSKA a Ewa JABŁOŃSKA, 2018. Parabens and their effects on the endocrine system. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 474, 238-251. DOI: 10.1016/j.mce.2018.03.014. ISSN 03037207. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720718301060>
- [70] HOGG, Stuart, 2005. *Essential microbiology*. Hoboken, NJ: John Wiley. ISBN 04-714-9753-3.
- [71] *Pseudomonas aeruginosa*, 2001-. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas\\_aeruginosa](https://cs.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa)
- [72] HEJAZI, A. a F. R. FALKINER, 1997. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*. 46(11), 903-912. DOI: 10.1099/00222615-46-11-903. ISSN 0022-2615. Dostupné také z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-46-11-903>
- [73] *Escherichia coli*, 2001-. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2018-11-14]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli](https://cs.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)
- [74] JIMENEZ, Luis a Stacey SMALLS, Molecular Detection of *Burkholderia cepacia* in Toilet, Cosmetic, and Pharmaceutical Raw Materials and Finished Products. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*. 2000(83 (4), 963-966. Dostupné také z: <https://pdfs.semanticscholar.org/1d93/176571f3a12ad3164730f3ad3a0710ba0b3c.pdf>
- [75] LUNDOV, M, J JOHANSEN, C ZACHARIAE a L MOESBY, 2012. Creams Used by Hand Eczema Patients are often Contaminated with *Staphylococcus aureus*. *Acta Dermato Venereologica*. 92(4), 441-442. DOI: 10.2340/00015555-1308. ISSN 0001-5555. Dostupné také z: <http://www.medicaljournals.se/acta/content/?doi=10.2340/00015555-1308>

- [76] DRÉNO, B., S. PÉCASTAINGS, S. CORVEC, S. VERALDI, A. KHAMMARI a C. ROQUES, 2018. Cutibacterium acnes ( Propionibacterium acnes ) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 32, 5-14. DOI: 10.1111/jdv.15043. ISSN 09269959. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jdv.15043>
- [77] PÉRIAMÉ, M., J.-M. PAGÈS a A. DAVIN-REGLI, 2014. Enterobacter gergoviae adaptation to preservatives commonly used in cosmetic industry. *International Journal of Cosmetic Science*. 36(4), 386-395. DOI: 10.1111/ics.12140. ISSN 01425463. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ics.12140>
- [78] PITT, T. L., J. MCCLURE, M. D. PARKER, A. AMÉZQUITA a P. J. MCCLURE, 2015. Bacillus cereus in personal care products: risk to consumers. *International Journal of Cosmetic Science*. 37(2), 165-174. DOI: 10.1111/ics.12191. ISSN 01425463. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ics.12191>
- [79] EARL, Ashlee M., Richard LOSICK a Roberto KOLTER, 2008. Ecology and genomics of Bacillus subtilis. *Trends in Microbiology*. 16(6), 269-275. DOI: 10.1016/j.tim.2008.03.004. ISSN 0966842X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X08000887>
- [80] KANDI, Venkataramana, Padmavali PALANGE, Ritu VAISH, Adnan Bashir BHATTI, Vinod KALE, Maheshwar Reddy KANDI a Mohan Rao BHOOMAGIRI, Emerging Bacterial Infection: Identification and Clinical Significance of Kocuria Species. *Cureus*. DOI: 10.7759/cureus.731. ISSN 2168-8184. Dostupné také z: <http://www.cureus.com/articles/4971-emerging-bacterial-infection-identification-and-clinical-significance-of-kocuria-species>
- [81] Micrococcus luteus, 2019. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Micrococcus\\_luteus](https://en.wikipedia.org/wiki/Micrococcus_luteus)
- [82] BENNETT, J. W. a M. KLICH, 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(3), 497-516. DOI: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003. ISSN 0893-8512. Dostupné také z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BC – *Bacillus cereus*

BS – *Bacillus subtilis*

CV – *Candida vini*

DU – diazolidinyl močovina

INCI – Mezinárodní názvosloví kosmetických ingrediencí (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*)

IU – imidazolidinyl močovina

KR – *Kocuria rosea*

KTJ – kolonii tvořící jednotka

MCI – methylchloroisothiazolinon

ML – *Micrococcus luteus*

MO – mikroorganismus

MI – methylisothiazolinon

SCCS – Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele (*Scientific Committee on Consumer Safety*)

SM – *Serratia marcescens*